Euroopan unionin
virallinen lehti

L 247

Suomenkielinen laitos

Lainsäädäntö

57. vuosikerta

21. elokuuta 2014

Sisältö

II *Muut kuin lainsäätämisjärjestyksessä hyväksyttävät säädökset*

ASETUKSET

★ **Komission asetus (EU) N:o 900/2014, annettu 15 päivänä heinäkuuta 2014, testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla annetun asetuksen (EY) N:o 440/2008 muuttamisesta sen mukauttamiseksi tekniikan kehitykseen** [1] 1

[1] ETA:n kannalta merkityksellinen teksti

FI

Säädökset, joiden otsikot on painettu laihalla kirjasintyypillä, ovat maatalouspolitiikan alaan kuuluvia juoksevien asioiden hoitoon liittyviä säädöksiä, joiden voimassaoloaika on yleensä rajoitettu.

Kaikkien muiden säädösten otsikot on painettu lihavalla kirjasintyypillä ja merkitty tähdellä.

II

(Muut kuin lainsäätämisjärjestyksessä hyväksyttävät säädökset)

ASETUKSET

KOMISSION ASETUS (EU) N:o 900/2014,

annettu 15 päivänä heinäkuuta 2014,

testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla annetun asetuksen (EY) N:o 440/2008 muuttamisesta sen mukauttamiseksi tekniikan kehitykseen

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan unionin toiminnasta tehdyn sopimuksen,

ottaa huomioon kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH), Euroopan kemikaaliviraston perustamisesta, direktiivin 1999/45/EY muuttamisesta sekä neuvoston asetuksen (ETY) N:o 793/93, komission asetuksen (EY) N:o 1488/94, neuvoston direktiivin 76/769/ETY ja komission direktiivien 91/155/ETY, 93/67/ETY, 93/105/EY ja 2000/21/EY kumoamisesta 18 päivänä joulukuuta 2006 annetun Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1907/2006 ([1]) ja erityisesti sen 13 artiklan 2 kohdan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Komission asetuksessa (EY) N:o 440/2008 ([2]) vahvistetaan asetuksen (EY) N:o 1907/2006 soveltamiseksi käytettävät testimenetelmät, joilla määritellään kemikaalien fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, myrkyllisyys ja myrkyllisyys ympäristölle.

(2) On tarpeen saattaa asetus (EY) N:o 440/2008 ajan tasalle, jotta siihen sisällytettäisiin ensisijaisena asiana OECD:n vastikään hyväksymät uudet ja ajantasaistetut testimenetelmät tekniikassa saavutetun kehityksen huomioon ottamiseksi ja sen varmistamiseksi, että koetarkoituksiin käytettävien eläinten määrää vähennetään Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivin 2010/63/EU ([3]) mukaisesti. Sidosryhmiä on kuultu tästä säädösluonnoksesta.

(3) Tämä mukauttaminen tekniikan kehitykseen sisältää kuusi uutta testimenetelmää myrkyllisyyden ja muiden terveydelle aiheutuvien vaikutusten määrittämiseksi, mukaan luettuna hermostonkehitykseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia koskeva tutkimus, laajennettu yhtä sukupolvea koskeva lisääntymismyrkyllisyystutkimus, siirtogeenisten jyrsijöiden *in vivo* -geenimutaatiokoe, *in vitro* -koe steroidihormonien synteesin vaikutusten arvioimiseksi sekä *in vivo* -kokeet estrogeenisten ja androgeenisten vaikutusten arvioimiseksi.

(4) Sen vuoksi asetusta (EY) N:o 440/2008 olisi muutettava.

(5) Tässä asetuksessa säädetyt toimenpiteet ovat asetuksen (EY) N:o 1907/2006 133 artiklalla perustetun komitean lausunnon mukaiset,

([1]) EUVL L 396, 30.12.2006, s. 1.
([2]) Komission asetus (EY) N:o 440/2008, annettu 30 päivänä toukokuuta 2008, testimenetelmien vahvistamisesta kemikaalien rekisteröinnistä, arvioinnista, lupamenettelyistä ja rajoituksista (REACH) annetun asetuksen (EY) N:o 1907/2006 nojalla (EUVL L 142, 31.5.2008, s. 1).
([3]) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta (EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33).

ON HYVÄKSYNYT TÄMÄN ASETUKSEN:

1 artikla

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 440/2008 liite tämän asetuksen liitteen mukaisesti.

2 artikla

Tämä asetus tulee voimaan kolmantena päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan unionin virallisessa lehdessä*.

Tämä asetus on kaikilta osiltaan velvoittava, ja sitä sovelletaan sellaisenaan kaikissa jäsenvaltioissa.

Tehty Brysselissä 15 päivänä heinäkuuta 2014.

Komission puolesta

Puheenjohtaja

José Manuel BARROSO

LIITE

Muutetaan asetuksen (EY) N:o 440/2008 liite seuraavasti:

Lisätään B.53, B.54, B.55, B.56, B.57 ja B.58 luku seuraavasti:

"B.53. **HERMOSTONKEHITYKSEEN KOHDISTUVIA MYRKYLLISYYSVAIKUTUKSIA KOSKEVA TUTKIMUS**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 426 (2007); OECD:n lisääntymis- ja kehitystoksisuutta käsittelevä työryhmä käsitteli Kööpenhaminassa kesäkuussa 1995 tarvetta päivittää voimassa olevia OECD:n lisääntymis- ja kehitystoksisuutta koskevia testiohjeita ja laatia uusia ohjeita päätetapahtumille, joita ei vielä ole käsitelty (1). Työryhmä suositteli, että testiohje hermostonkehitykseen kohdistuvasta neurotoksisuudesta laaditaan Yhdysvaltojen ympäristönsuojeluviraston ohjeiden perusteella. Näitä ohjeita on sittemmin tarkistettu (2). Kööpenhaminassa pidettiin kesäkuussa 1996 toinen kuulemiskokous, jossa sihteeristölle annettiin ohjeita hermostonkehitykseen kohdistuvaa neurotoksisuutta koskevien uusien testiohjeiden laadinnasta, mukaan lukien keskeiset näkökohdat, kuten eläinlajin valinta, annostelujakso, testausajankohta, arvioitavat päätetapahtumat ja tuloksien arviointia koskevat kriteerit. Yhdysvaltojen ohjeet neurotoksisuutta koskevasta riskiarvioinnista julkaistiin vuonna 1998 (3). OECD:n asiantuntijakomitean kokous ja International Life Science Institute -organisaation Risk Science Institute -tiedeinstituutin työryhmä kokoontui lokakuussa 2000, ja asiantuntijoiden kuulemiskokous pidettiin Tokiossa vuonna 2005. Näissä kokouksissa käsiteltiin nykyisen testiohjeen tieteellisiä ja teknisiä kysymyksiä, ja kokouksien suositukset (4)(5)(6)(7) otettiin huomioon tämän testimenetelmän kehittämisessä. Lisätiedot tämän testimenetelmän toteutuksesta, tulkinnasta ja terminologiasta sisältyvät lisääntymistoksisuuden testaamista ja arviointia koskevaan OECD:n ohjeasiakirjaan 43 (8) ja neurotoksisuuden testaamista koskevaan ohjeasiakirjaan 20 (9).

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT

2. Useiden kemikaalien tiedetään aiheuttavan ihmisten ja muiden lajien hermostonkehitykselle myrkyllisyysvaikutuksia (10)(11)(12)(13). Hermostonkehitykselle mahdollisesti aiheutuvien myrkyllisyysvaikutusten määrittelyä voidaan tarvita kemikaalin myrkyllisen vaikutusten arviointiin. Tutkimukset hermostonkehitykseen kohdistuvista myrkyllisyysvaikutuksia on suunniteltu siten, että niillä tarjotaan tietoja, myös annos-vastesuhteen kuvauksia, sellaisista mahdollisista toiminnallisista ja morfologisista vaikutuksista poikasten kehittyvään hermostojärjestelmään, jotka voivat aiheutua kemikaalille altistumisesta kohdussa ja varhaisessa kehitysvaiheessa.

3. Tutkimus hermostonkehitykseen kohdistuvista myrkyllisyysvaikutuksista voidaan suorittaa erillisenä tutkimuksena, joka sisällytetään tutkimukseen lisääntymiselle ja/tai täysikasvuisille eläimille aiheutuvista myrkyllisyysvaikutuksista (kuten testimenetelmät B.34 (14), B.35 (15) ja B.43 (16)), tai se voidaan lisätä tutkimukseen syntymää edeltävistä myrkyllisyysvaikutuksista (esim. testimenetelmä B.31 (17)). Jos tutkimus hermostonkehitykseen kohdistuvista myrkyllisyysvaikutuksista sisällytetään toiseen tutkimukseen, on tärkeää säilyttää kummankin tutkimustyypin yhtenäisyys. Kaikissa testeissä olisi noudatettava voimassa olevaa lainsäädäntöä taikka viranomaisten tai instituutioiden antamia ohjeita koe-eläinten käytöstä tutkimuksissa (kuten 18).

4. Koelaboratorion on otettava huomioon kaikki testikemikaalista saatavilla olevat tiedot ennen tutkimuksen suorittamista. Näihin sisältyvät kemikaalin tunnistetiedot ja rakenne, sen fysikokemialliset ominaisuudet, kaikkien muiden kemikaalilla *in vivo* tai *in vitro* suoritettujen toksisuuskokeiden tulokset, rakenteellisesti samanlaisten aineiden toksikologiset tiedot ja kemikaalin odotettu käyttötapa. Nämä tiedot ovat välttämättömiä kaikkien asianosaisten vakuuttamiseksi siitä, että kokeella on merkitystä ihmisten terveyden suojelulle ja että sen avulla voidaan valita sopiva aloitusannos.

TESTIN PERIAATE

5. Testikemikaali annostellaan eläimille tiineys- ja imetysaikana. Emoja testataan tiineisiin ja imettäviin naaraisiin aiheutuvien vaikutusten arvioimiseksi ja mahdollisesti vertailutietojen tarjoamiseksi (emot poikasiin verrattuna). Poikaset valitaan poikueista sattumanvaraisesti neurotoksisuuden arviointia varten. Arviointiin sisältyy näkyvien neurologisten ja käytösmuutosten havainnointi, mukaan lukien arviointi fyysisestä kehityksestä, käytöksen kehityksestä, motorisesta aktiviteetista, motorisesta ja aistien toiminnasta sekä oppimisesta ja muistista; myös aivojen painoa ja neuropatologiaa syntymän jälkeisen kehityksen ja kypsän iän aikana arvioidaan.

6. Jos testimenetelmä toteutetaan erillisenä tutkimuksena, myös muita kussakin ryhmässä käytettävissä olevia eläimiä voidaan käyttää tiettyihin hermostoperäisiin käyttäytymisoireisiin liittyviin, neuropatologisiin, neurokemiallisiin tai sähköfysiologisiin tutkimuksiin. Näin voidaan täydentää tässä testimenetelmässä suositelluista tutkimuksista saatuja tietoja (16)(19)(20)(21). Täydentävät tutkimukset voivat olla erityisen hyödyllisiä, kun empiiriset havainnot tai ennakoidut vaikutukset taikka menettely/vaikutustapa osoittavat kemikaalin neurotoksisuuden olevan tietyn tyyppistä. Näitä täydentäviä toimenpiteitä voidaan soveltaa emoihin ja poikasiin. Lisäksi voidaan käyttää *ex vivo*- tai *in vitro* -menettelyjä, kunhan ne eivät vaikuta *in vivo* -menettelyjen yhtenäisyyteen.

TESTIN VALMISTELU

Eläinlajin valinta

7. Suositeltavin testieläinlaji on rotta, mutta muita lajeja voidaan käyttää tarvittaessa. On kuitenkin pantava merkille, että tässä testimenetelmässä määritetyt tiineysajan ja synnytyksen jälkeiset päivät ovat ominaisia yleisesti käytetyille rottakannoille, joten eri lajeja tai epätavallisia kantoja käytettäessä olisi valittava vertailukelpoiset päivät. Toisen lajin käyttöä olisi perusteltava toksikologisilla, farmakokineettisillä ja/tai muilla tiedoilla. Perusteluun olisi sisällyttävä lajispesifisten syntymän jälkeisiin hermostoperäisiin käytösoireisiin liittyvien ja neuropatologisten arviointien saatavuus. Jos aiemmassa testissä ilmeni ongelmia, siinä käytettyä lajia/kantaa olisi harkittava tarkemmin. Eri rottakantojen käyttöön liittyvien tehokkuuskriteerien vuoksi on todistettava, että valitun kannan hedelmällisyys ja vaste on riittävä. Muiden lajien käytön luotettavuutta ja herkkyyttä hermostonkehitykseen kohdistuvien myrkyllisyysvaikutuksien havaitsemiseksi tulee dokumentoida.

Koe-eläinten häkit ja eläinten ruokinta

8. Koe-eläinhuoneen lämpötilan pitäisi olla 22 ± 3 °C. Vaikka suhteellisen kosteuden pitäisi olla vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää). Valaistussyklin suuntaa on myös mahdollista muuttaa ennen parittelua ja tutkimuksen keston ajaksi, jotta toimintaa ja käytöstä koskevia päätetapahtumia voidaan arvioida pimeän aikana (punaisessa valossa), eli silloin kuin eläimet ovat tavanomaisesti aktiivisia (22). Kaikkiin valaistussykliin tehtäviin muutoksiin olisi sisällyttävä riittävä sopeutumisaika, jotta eläimet voivat mukautua uuteen sykliin. Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon ja veden tyyppi olisi ilmoitettava ja kummankin epäpuhtaudet olisi analysoitava.

9. Eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai muutaman samaa sukupuolta olevan eläimen ryhmissä. Parituksen tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Kun parituksen voidaan todeta tapahtuneen tai viimeistään tiineyden 15. päivänä kukin pariutunut naaras siirretään omaan synnytys- tai poikimishäkkiinsä. Häkit on sijoitettava siten, että niiden sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Paritetuille eläimille on annettava synnytyksen lähestyessä asianmukaiset ja etukäteen määritellyt pesäntekoaineet. On tiedossa, että epäasianmukainen käsittely tai tiineyden aikainen stressi voivat johtaa haitallisiin vaikutuksiin, kuten sikiön menetykseen sekä sikiön ja vastasyntyneen kehityksen muutoksiin. Jotta sikiön menettäminen muista kuin altistukseen liittyvistä syistä estettäisiin, tiineiden eläinten tarpeetonta käsittelyä sekä ulkoisten tekijöiden, kuten melun, aiheuttamaa stressiä pitäisi välttää.

Eläinten valmistelu

10. Olisi käytettävä terveitä eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin ja joita ei ole aiemmin käytetty testeihin, ellei tutkimusta sisällytetä toiseen tutkimukseen (ks. 3 kohta). Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Kullekin eläimelle olisi annettava oma tunnistenumero ja se olisi merkittävä sillä. Eläinten tulee olla kaikissa testiryhmissä samanpainoisia ja -ikäisiä niin tarkasti kuin on käytännössä mahdollista ja olla tutkittavan lajin ja kannan normaaleissa rajoissa. Kullakin annostasolla tulee käyttää nuoria täysikasvuisia naaraita, jotka eivät ole synnyttäneet. Sisarusten pariutumista tulee välttää, ja tämän varmistamisesta olisi huolehdittava. Tiineyspäivä 0 on se päivä, jolloin vaginan tulpitus ja/tai sperma havaitaan. Riittävä sopeutumisaika (esim. kahdesta kolmeen päivään) pitäisi varmistaa, kun toimittajalta ostetaan eläimiä, joiden tiineyttä valvotaan. Paritetut naaraat olisi jaettava satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmään, ja eläimet olisi jaettava mahdollisuuksien mukaan tasaisesti molempiin ryhmiin (jotta kaikki ryhmät jaetaan tasaisesti, suositellaan satunnaista ositettua menettelyä, kuten sellaista, joka perustuu ruumiinpainoon). Samoin on meneteltävä saman uroksen hedelmöittämien naaraiden kohdalla.

TESTIN SUORITTAMINEN

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

11. Kussakin testi- ja kontrolliryhmässä pitäisi olla tarpeeksi monta testikemikaalille altistettua tiineenä olevaa naarasta, jotta varmistetaan, että neurotoksisuuden arviointia varten saadaan tuotettua riittävä määrä poikasia. Kutakin annostasoa varten suositellaan 20 poikuetta. Rinnakkaisia ja porrastettuja ryhmiä koskevat annostussuunnitelmat sallitaan, jos kunkin ryhmän poikueiden kokonaismäärät saavutetaan ja rinnakkaiskokeita varten käytetään asianmukaisia tilastollisia malleja.

12. Syntymän jälkeisenä päivänä, jäljempänä 'SJP', 4 tai sitä ennen (synnytyspäivä on syntymän jälkeinen päivä 0) kunkin poikueen kokoa olisi mukautettava poistamalla ylimääräiset poikaset satunnaisella valinnalla, jotta kaikkien poikueiden koko on sama (23). Poikueen koko ei saisi ylittää käytetyn jyrsijäkannan keskimääräistä poikuekokoa (8–12). Poikueessa olisi oltava — mahdollisimman suuressa määrin — yhtä monta koiras- ja naaraspuolista poikasta. Poikasten valikoiva poistaminen esimerkiksi ruumiinpainon perusteella ei ole tarkoituksenmukaista. Poikueiden yhdenmukaistamisen jälkeen (karsinta) ja ennen toiminnallisten päätetapahtumien testaamista kukin vieroitusta edeltävään tai sitä seuraavaan testiin tarkoitettu poikanen olisi tunnistettava yksilöllisesti käyttäen mitä tahansa inhimillistä keinoa poikasen tunnistamiseksi (esim. 24).

Eläinten jakaminen toiminnallisiin ja käyttäytymistä mittaaviin testeihin, aivojen paino ja neuropatologiset arvioinnit

13. Testimenetelmässä käytetään erilaisia tapoja jakaa kohdussa ja imettämisen aikana altistetut eläimet toiminnallisia ja käyttäytymistä mittaavia testejä, sukukypsyyttä ja aivojen painon määrittelyä sekä neuropatologista arviointia varten (25). Muita hermostoperäisiin käytösoireisiin (kuten sosiaalinen käyttäytyminen), neurokemiaan tai neuropatologiaan liittyviä testejä voidaan lisätä tapauskohtaisesti sillä edellytyksellä, että alkuperäisten vaadittujen testien luotettavuutta ei vaaranneta.

14. Poikaset valitaan kustakin annosryhmästä ja niistä tehdään tutkittavien ominaisuuksien arviointi syntymän jälkeisenä päivänä 4. Poikaset valitaan siten, että kustakin poikueesta valitaan mahdollisuuksien mukaan kumpaakin sukupuolta jokaiseen annosryhmään niin, että ne ovat tasapuolisesti edustettuina kaikissa testeissä. Motorista aktiviteettia koskevassa testissä olisi testattava samaa uros- ja naarasparia kaikissa vieroitusta edeltävissä ikäryhmissä (ks. 35 kohta). Kaikkien muiden testien osalta voidaan valita samoja tai erillisiä uros- ja naaraspareja erilaisiin käyttäytymistä mittaaviin testeihin. Kognitiivisia toimintoja mittaaviin vastavieroitettuja ja täysikasvuisia vertaileviin testeihin voidaan joutua valitsemaan eri poikaset. Näin vältetään se, että ikä ja aikaisempi opetus häiritsevät näitä mittauksia (26)(27). Vieroitusajankohdalla (syntymän jälkeinen päivä 21) poikaset, joita ei ole valittu testeihin, voidaan lopettaa inhimillisellä tavalla. Kaikki poikasten valintaan liittyvät muutokset olisi raportoitava. Tilastollisen mittayksikön pitäisi olla poikue (tai emo), ei poikanen.

15. On erilaisia tapoja valita poikaset vieroitusta edeltäviin ja sitä seuraaviin tutkimuksiin, kognitiivisiin testeihin, patologisiin tutkimuksiin jne. (ks. kuva 1 yleisestä suunnittelusta ja liite 1 valintatapoja koskevista esimerkeistä). Suositellut eläinten vähimmäismäärät kussakin annosryhmässä vieroitusta edeltäviä ja sitä seuraavia tutkimuksia varten ovat seuraavat:

Kliiniset havainnot ja ruumiinpaino	Kaikki eläimet
Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot	20/sukupuoli (1/sukupuoli/poikue)
Aivojen paino (fiksaation jälkeen) SJP 11–22	10/sukupuoli (1/poikue)
Aivojen paino (ilman fiksaatiota) ~ SJP 70	10/sukupuoli (1/poikue)
Neuropatologia (immersio- tai perfuusiofiksaatio) SJP 11–22	10/sukupuoli (1/poikue)
Neuropatologia (perfuusiofiksaatio) SJP ~ 70	10/sukupuoli (1/poikue)

Sukukypsyys	20/sukupuoli (1/sukupuoli/poikue)
Muut kehitykseen liittyvät tuntomerkit (vapaaehtoinen)	Kaikki eläimet
Käytöksen kehitys	20/sukupuoli (1/sukupuoli/poikue)
Motorinen aktiviteetti	20/sukupuoli (1/sukupuoli/poikue)
Motorinen ja aistien toiminta	20/sukupuoli (1/sukupuoli/poikue)
Oppiminen ja muisti	10/sukupuoli [a] (1/poikue)

[a] Kognitiivista toimintaa koskevien testien herkkyydestä riippuen suuremman eläinmäärän tutkimista olisi harkittava, esimerkiksi enintään 1 koiras- ja 1 naaraspuolinen eläin poikuetta kohti (eläinten valinta, ks. liite 1) (lisäohjeistus otoskoosta annetaan OECD:n ohjeasiakirjassa 43 (8)).

Annostasot

16. On käytettävä vähintään kolmea annostasoa ja rinnakkaista kontrolliryhmää. Annostasojen välit määritetään siten, että toksiset vaikutukset saadaan porrastettua. Mikäli testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, se olisi valittava siten, että emoille aiheutetaan joitain myrkytysoireita (esim. kliinisiä löydöksiä, ruumiinpainon väheneminen (ei yli 10 prosenttia) ja/tai todisteet annostusta rajoittavasta toksisuudesta kohde-elimessä). Korkeinta annostasoa voidaan rajoittaa niin, että se on 1 000 mg/painokilo/vrk. On myös joitain poikkeustapauksia. Esimerkiksi odotettavissa oleva ihmisten altistuminen voi merkitä, että tarvitaan korkeampaa annostasoa. Vaihtoehtoisesti olisi tehtävä esitutkimuksia tai alustavia raja-annostutkimuksia sellaisen suurimman käytettävän annoksen määrittämiseksi, jonka pitäisi aiheuttaa emoille vähiten myrkyllisyysvaikutuksia. Jos testikemikaalin on todettu aiheuttavan sikiönkehitykseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia tavanomaisessa kehitystoksisuutta koskevassa tutkimuksessa tai esitutkimuksessa, suurimman annostason pitäisi olla suurin annos, joka ei aiheuta liikaa myrkyllisiä vaikutuksia poikasissa tai kohdussa taikka vastasyntyneiden kuolemaa tai epämuodostumia, jotka riittäisivät estämään neurotoksisuuden asianmukaisen arvioinnin. Pienimmän annostason tavoitteena pitäisi olla se, että sillä ei aiheuteta mitään emoihin tai kehitykseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia, mukaan lukien neurotoksisuus. Annostasot valitaan asteittain alenevasti. Näin osoitetaan mahdollinen annosvaste ja haitaton vaikutustaso (NOAEL) tai lähellä havaitsemisrajaa olevat annokset, joiden perustella voidaan määrittää vertailukohtana oleva annos. Vähintään kaksinkertaiset ja enintään nelinkertaiset annostasojen välit ovat usein optimaaliset, kun asetetaan alenevat annostasot. Usein on parempi lisätä neljäs annosryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi yli kymmenkertaisia annosvälejä).

17. Annostasojen valinnassa olisi otettava huomioon kaikki aikaisemmat toksisuustiedot sekä tiedot testikemikaalin tai sen kanssa samantyyppisten materiaalien metaboloitumisesta ja toksikokineettisistä ominaisuuksista. Näillä tiedoilla voidaan myös tukea sen osoittamista, että annostus on valittu oikein. Annosten antamista suoraan poikasille olisi harkittava altistus- ja farmakokineettisten tietojen perusteella (28)(29). Ennen kuin tehdään tutkimuksia suorasta annostuksesta, olisi harkittava huolellisesti etuja ja haittoja (30).

18. Rinnakkaisen kontrolliryhmän pitäisi olla joko plaseboa saava kontrolliryhmä tai kantaja-ainetta saava kontrolliryhmä, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Kaikille ryhmille annetaan tavanomaisesti tilavuudeltaan sama määrä joko testikemikaalia tai kantaja-ainetta eläimen painon perusteella. Jos annostelun helpottamiseksi käytetään kantaja-ainetta tai muuta lisäainetta, on syytä selvittää: sen vaikutus imeytymiseen, jakautumiseen, metaboloitumiseen tai elimistössä säilymiseen; vaikutukset testikemikaalin kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka saattavat muuttaa sen toksisia ominaisuuksia; sekä vaikutukset koe-eläinten ravinnon ja juoman kulutukseen tai ravitsemustilaan. Kantaja-aine ei saisi aiheuttaa vaikutuksia, jotka voivat olla esteenä tutkimuksen tulkinnalle, eikä sillä saisi olla toksisia hermostoperäisiä käyttäytymiseen kohdistuvia vaikutuksia tai vaikutuksia lisääntymiseen tai kehitykseen. Jos käytetään uutta kantaja-ainetta, kantaja-ainetta saavan kontrolliryhmän lisäksi tutkimukseen sisällytetään plaseboa saava kontrolliryhmä. Kontrolliryhmän tai -ryhmien eläimiä tulee käsitellä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä.

Antotapa

19. Testikemikaalia tai kantaja-ainetta olisi annettava ihmisten altistumiselle asianmukaisinta reittiä. Tämä perustuu koe-eläinten metaboloitumisesta ja jakautumisesta saatavilla olevaan tietoon. Ainetta annetaan tavallisesti suun kautta (esim. letkulla, ravinnon tai juomaveden välityksellä), mutta myös muuta reittiä voidaan käyttää (esim. ihon tai inhalaation kautta). Tämä riippuu ominaisuuksista taikka odotettavissa olevista tai tunnetuista ihmisen altistusreiteistä (lisäohjeita annetaan ohjeasiakirjassa 43 (8)). Valitusta antoreitistä olisi esitettävä perustelu. Testiaine annetaan päivittäin suunnilleen samaan aikaan.

20. Kunkin eläinyksilön annoksen pitäisi yleensä perustua viimeisimpään eläimen ruumiin painon määritykseen. Annoskoon määrittämisessä on kuitenkin toimittava erityisen huolellisesti viimeisen tiineyskolmanneksen aikana. Jos testikemikaalia saaneissa emoissa havaitaan kuitenkin liian suuria myrkyllisyysvaikutuksia, nämä eläimet on lopetettava inhimillisellä tavalla.

21. Testikemikaalia tai kantaja-ainetta olisi annosteltava vähintään päivittäin paritelluille naaraille munasolun kohdun seinämään kiinnittymisestä lähtien (tiineyspäivä 6) koko imetyksen ajan (SJP 21), jotta poikaset altistetaan testikemikaalille syntymää edeltävän ja sen jälkeisen neurologisen kehityksen aikana. Ikää, jolloin annostus aloitetaan sekä annostuksen kestoa ja tiheyttä voidaan mukauttaa, jos on näyttöä, jolla tuetaan ihmisten altistumisen suhteen asianmukaisempaa koejärjestelyä. Annostuksen kestoa olisi mukautettava toisiin lajeihin nähden, jotta altistuminen aivojen kehityksen varhaisessa vaiheessa (joka vastaa ihmisen aivojen syntymää edeltävää ja varhaista syntymän jälkeistä kasvuvaihetta) varmistetaan. Annostelu voidaan aloittaa tiineyden alkamisajankohdasta (tiineyspäivä 0). On kuitenkin kiinnitettävä huomiota siihen mahdollisuuteen, että testikemikaali voi päättää tiineyden, ennen kuin munasolu kiinnittyy kohdun seinämään. Tiineyspäivänä 6 aloitetulla annostuksella vältettäisiin tämä riski, mutta kehitysvaiheita tiineyspäivän 0 ja 6 välillä ei katettaisi. Jos laboratorio hankkii aikaparitettuja eläimiä, ei ole käytännöllistä aloittaa annostusta tiineyspäivänä 0, vaan asianmukainen aloituspäivä on tiineyspäivä 6. Koelaboratorion olisi mukautettava annostusta testiaineen vaikutuksia koskevien asianmukaisten tietojen, aikaisempien kokemusten ja logististen näkökohtien perusteella. Tähän voi sisältyä annostuksen jatkaminen vieroituksen jälkeen. Annostelua ei suoriteta synnytyspäivänä niille eläimille, joiden synnytys on kesken. Yleisesti oletetaan, että poikaset altistuvat äidinmaidon kautta, mutta poikasille suoraan annettavia annoksia olisi harkittava tapauksissa, joissa poikasten jatkuvasta altistuksesta puuttuu näyttöä. Näyttö jatkuvasta altistuksesta voidaan saada esimerkiksi farmakokineettisistä tiedoista, poikasiin kohdistuvasta toksisuudesta tai biomarkkereiden muutoksista (28).

TARKKAILU

Emojen tarkkailu

22. Kaikkien emojen terveydentilaa, sairastuneisuutta ja kuolleisuutta olisi seurattava ainakin kerran päivässä.

23. Käsittelytoimenpide- ja havaintojaksojen aikana olisi tehtävä säännöllisesti yksityiskohtaisempia kliinisiä havaintoja (ainakin kahdesti tiineysajan annosten antamisjaksolla ja kahdesti imetysajan annosten antamisjaksolla) käyttäen ainakin kymmentä emoa annostasoa kohti. Koulutettujen teknikoiden, jotka eivät ole tietoisia eläinten käsittelytiedoista, olisi tarkkailtava eläimiä niiden häkin ulkopuolella. Heidän pitäisi soveltaa standardoituja menettelyitä, joita käytetään eläinten stressin ja tarkkailijan ennakkokäsitysten vähimmäistämiseksi ja tarkkailijoiden välisen luotettavuuden maksimoimiseksi. On suositeltavaa, että havainnot tietyssä tutkimuksessa tekee sama teknikko, kun tämä on mahdollista.

24. Havaitut oireet on kirjattava. Myös havaittujen oireiden voimakkuus on kirjattava mahdollisuuksien mukaan. Kliinisiä havaintoja on tehtävä muun muassa ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, mahdollisten eritteiden erityksen sekä autonomisen hermoston toiminnan muutoksista (esimerkiksi kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, poikkeavuudet hengityksessä ja/tai ilman haukkominen, kaikki virtsaamiseen tai ulostamiseen liittyvät epätavalliset oireet).

25. Myös kaikki kehon asentoon, aktiivisuustasoon (esimerkiksi vakioalueen vähentynyt tai lisääntynyt tutkiminen) ja liikekoordinaatioon liittyvät epätavalliset vasteet on kirjattava. Muutokset käynnissä (esimerkiksi vaappuminen ja ataksia), asennossa (esimerkiksi selän köyristäminen) ja käsittelyyn, paikkaan tai muihin ympäristön ärsykkeisiin liittyvässä reaktiivisuudessa sekä klooniset tai tooniset liikkeet, kouristukset tai vapina, stereotypiat (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, epätavalliset pään liikkeet, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi pureminen tai ylenmääräinen nuoleminen, itsensä silpominen, takaperin käveleminen, ääntely) tai aggressiivisuus on kirjattava.

26. Myrkytysoireet olisi kirjattava, mukaan lukien oireiden alkamispäivä, vuorokaudenaika, voimakkuus ja kesto.

27. Eläimet punnitaan tutkimuksen aikana annosteluajankohdalla ainakin viikoittain, synnytyspäivänä tai sen lähellä ja syntymän jälkeisenä päivänä 21 (vieroitus). Emot olisi punnittava letkuruokintatutkimuksia varten ainakin kahdesti viikossa. Annoksia olisi mukautettava kunkin painonmäärityksen ajankohdalla tarpeen mukaan. Ravinnonkulutusta olisi mitattava viikoittain vähintään tiineyden ja imetyksen aikana. Vedenkulutusta olisi mitattava ainakin viikoittain, jos eläin altistuu veden välityksellä.

Poikasten tarkkailu

28. Kaikkien poikasten myrkytysoireita, sairastuneisuutta ja kuolleisuutta seurataan ainakin kerran päivässä.

29. Käsittelytoimenpide- ja havaintojaksojen aikana olisi tehtävä yksityiskohtaisempia kliinisiä havaintoja poikasista. Koulutettujen teknikoiden, jotka eivät ole tietoisia eläinten käsittelytiedoista, olisi tarkkailtava poikasia (ainakin yksi poikanen/sukupuoli/poikue). Heidän pitäisi käyttää standardoituja menettelyitä tarkkailijan ennakkokäsitysten vähimmäistämiseksi ja tarkkailijoiden välisen luotettavuuden enimmäistämiseksi. On suositeltavaa, että havainnot tekee sama teknikko, kun tämä on mahdollista. Vähintään 24 ja 25 kohdassa kuvattuja päätetapahtumia olisi tarkkailtava, kun se on asianmukaista tarkkailtavassa kehitysvaiheessa.

30. Kaikki poikasten myrkytysoireet olisi kirjattava mukaan lukien oireiden alkamispäivä, vuorokaudenaika, voimakkuus ja kesto.

Fyysiset ja kehitystä koskevat tuntomerkit

31. Muutokset vieroitusta edeltävissä kehitystä koskevissa tuntomerkeissä (esim. korvalehden avautuminen, silmien avautuminen, etuhampaan puhkeaminen) korreloivat merkittävästi ruumiinpainon kanssa (30)(31). Ruumiinpaino voi olla fyysisen kehityksen paras indikaattori. Kehitystä koskevien tuntomerkkien määrittäminen on tämän vuoksi suositeltavaa ainoastaan, kun on ennalta näyttöä, että näillä tuloksilla tarjotaan lisätietoja. Näiden parametrien arvioinnin ajoitus esitetään taulukossa 1. Oletetuista vaikutuksista ja ensimmäisten määritysten tuloksista riippuen voi olla suositeltavaa lisätä muita ajankohtia tai tehdä määrityksiä muissa kehitysvaiheissa.

32. Fyysisen kehityksen arvioinnissa on suositeltavaa käyttää syntymän jälkeisen iän sijasta yhdynnän jälkeistä ikää (33). Jos poikasia testataan vieroituspäivänä, on suositeltavaa, että testi tehdään ennen varsinaista vieroitusta, jotta vältetään vieroitukseen liittyvän stressin aiheuttama häiritsevä vaikutus. Lisäksi mitään vieroituksen jälkeistä poikasten testiä ei pitäisi suorittaa vieroituksen jälkeisen kahden päivän aikana.

Taulukko 1

Fyysisten ja kehitystä koskevien tuntomerkkien sekä toiminnallisten ja käyttäytymistä mittaavien tulostapahtumien arvioinnin ajoittaminen [a]

Päätetapahtumat \ Ikäväli	Ennen vieroitusta [b]	Kasvuiässä [b]	Nuoret täysikasvuiset [b]
Fyysiset ja kehitystä koskevat tuntomerkit			
Ruumiinpaino ja kliiniset havainnot	viikoittain [c]	vähintään kahden viikon välein	vähintään kahden viikon välein
Aivojen paino	SJP 22 [d]		lopettamisen yhteydessä
Neuropatologia	SJP 22 [d]		lopettamisen yhteydessä
Sukukypsyys	—	tarvittaessa	—
Muut kehitystä koskevat tunnusmerkit [e]	tarvittaessa	—	—

Päätetapahtumat / Ikäväli	Ennen vieroitusta [b]	Kasvuiässä [b]	Nuoret täysikasvuiset [b]
Toiminnalliset ja käyttäytymistä mittaavat tulostapahtumat			
Käytöksen kehitys	ainakin kaksi määritystä		
Motorinen aktiviteetti (mukaan lukien tottuminen)	1–3 kertaa [f]	—	kerran
Motorinen ja aistien toiminta	—	kerran	kerran
Oppiminen ja muisti	—	kerran	kerran

[a] Tähän taulukkoon sisältyvät vähimmäismäärät niistä kerroista, kun määritys olisi suoritettava. Oletetuista vaikutuksista ja ensimmäisten määritysten tuloksista riippuen voi olla suositeltavaa lisätä muita ajankohtia (esim. ikääntyneet eläimet) tai tehdä määrityksiä muissa kehitysvaiheissa.
[b] On suositeltavaa, ettei poikasia testata vieroituksen jälkeisen kahden päivän aikana (ks. 32 kohta). Kasvuiässä olevien eläinten testien ikäsuositukset ovat: oppiminen ja muisti = SJP 25 ± 2; motorinen ja aistien toiminta = SJP 25 ± 2. Nuorten täysikasvuisten eläinten suositusikä on SJP 60–70.
[c] Ruumiinpaino olisi mitattava ainakin kahdesti viikossa, kun poikaset saavat annokset suoraan, ja annoksia mukautetaan ajankohdalla, jolloin painonnousu on nopeaa.
[d] Aivojen painoa ja neuropatologiaa voidaan arvioida tarvittaessa aiemmin (esim. SJP 11) (ks. 39 kohta).
[e] Ruumiinpainon lisäksi muut kehitystä koskevat tunnusmerkit (esim. silmien avautuminen) olisi tarvittaessa kirjattava (ks. 31 kohta).
[f] Ks. 35 kohta.

33. Elävät poikaset lasketaan ja niiden sukupuoli määritetään esim. silmämääräisesti tai mittaamalla peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys (34)(35). Poikueen kukin poikanen olisi punnittava erikseen syntymähetkellä tai pian sen jälkeen ainakin viikoittain koko imetyksen ajan vähintään kerran kahdessa viikossa sen jälkeen. Kun sukukypsyyttä arvioidaan, eläimen ikä ja ruumiinpaino olisi määriteltävä emättimen avautuessa (36) tai esinahan erotessa terskasta (37) ainakin yhdestä uros- ja naarapuolisesta eläimestä poikuetta kohti.

Käytöksen kehitys

34. Valikoitujen käyttäytymistapojen kehittyminen määritellään ainakin yhden poikasen/sukupuolen/poikueen osalta asianmukaisen ikävälin aikana, ja samoja poikasia käytetään kaikkina testipäivinä kustakin arvioinnin kohteena olevasta käyttäytymistavasta. Mittauspäivät jaetaan tasaisesti kyseiselle ajanjaksolle. Tällä tavoin määritellään kyseisen käyttäytymistavan kehityksen normaalit tai käsittelyyn liittyvät muutokset (38). Seuraavat ovat esimerkkejä käytöstavoista, joiden kehittymistä voitaisiin arvioida: oikaisurefleksi, ylöspäin suuntautuva liike ja motorinen aktiviteetti (38)(39)(40).

Motorinen aktiviteetti

35. Motorista aktiviteettia olisi seurattava (41)(42)(43)(44)(45) vieroitusta edeltävällä ajanjaksolla ja täysikasvuisen iässä. Kun testi suoritetaan vieroituksen aikana, ks. 32 kohta. Testin olisi kestettävä riittävän pitkään, jotta voidaan osoittaa testijakson sisäinen sopeutuminen, kun kyseessä ovat altistamattomat kontrollit. Motorisen aktiviteetin käyttö käytöksen kehityksen arviointia varten on erittäin suositeltavaa. Jos sitä käytetään käytöksen kehityksen testaamiseen, testissä käytetään samoja eläimiä kaikkien vierotusta edeltävien testijaksojen osalta. Testejä pitäisi suorittaa tarpeeksi usein testijakson sisäisen sopeutumiskehityksen arviointia varten (44). Tämä saattaa edellyttää kolmea tai useampaa ajankohtaa vieroituspäivään mennessä ja se mukaan lukien (esim. SJP 13, 17, 21). Samojen eläinten tai saman poikueen eläinten testi olisi suoritettava myös täysikasvuisilla lähellä tutkimuksen päättymisajankohtaa (esim. SJP 60–70). Tutkimuksia lisäpäivinä voidaan suorittaa tarpeen mukaan. Motorista toimintaa olisi valvottava toimintaa mitattavalla automaattilaitteella, jolla voidaan selvittää toiminnan vähentyminen ja lisääntyminen (eli laitteen mittaaman lähtötilanteen ei pitäisi olla niin alhainen, että toiminnan vähentymisen havaitseminen estetään, eikä niin suuri, että estetään toiminnan lisääntymisen havaitseminen). Kutakin laitetta olisi testattava vakiomuotoisilla menettelyillä, jotta toiminnan luotettavuus varmistetaan mahdollisuuksien mukaan laitteiden ja tutkimuspäivien osalta. Testiryhmiä olisi tasapainotettava mahdollisuuksien mukaan laitteisiin nähden. Kukin eläin olisi testattava erikseen. Testiryhmiä olisi tasapainotettava testiajankohtiin nähden, jotta vältetään

häiritsemästä toiminnan vuorokausirytmiä. Olisi pyrittävä varmistamaan, että testiolosuhteiden muutokset ovat mahdollisimman vähäiset ja että ne eivät liity järjestelmällisesti käsittelyyn. Muuttujat, jotka voivat vaikuttaa moniin käyttäytymistä, myös motorista aktiviteettia, koskeviin määrityksiin, ovat äänitaso, testihäkin koko ja muoto, lämpötila, suhteellinen kosteus, valaistusolosuhteet, hajut, kotihäkin tai uuden testihäkin käyttö ja ympäristön häiriötekijät.

Motorinen ja aistien toiminta

36. Motorista ja aistien toimintaa olisi tarkasteltava yksityiskohtaisesti ainakin kerran, kun eläin on kasvuiässä ja kerran, kun se on nuori täysikasvuinen eläin (esim. SJP 60–70). Jos testi suoritetaan vieroitusaikana, ks. 32 kohta. Olisi suoritettava riittävä testi, jotta sensorisesta toiminnasta (esim. somatosensorinen, vestibulaarinen) ja motorisesta toiminnasta (esim. voimakkuus, koordinaatio) varmistetaan riittävä määrällinen näytteenotto. Muutamia esimerkkejä motorisesta ja aistien toiminnasta ovat ojentajalihaksen työntövoimarefleksi (46), suoristusrefleksi (47)(48), akustinen säpsähdysvaste (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) ja herätepotentiaalit (55).

Oppimisen ja muistin testaaminen

37. Assosiatiivista oppimista ja muistia koskeva testi olisi suoritettava vieroituksen jälkeen (esim. 25 ± 2 päivää) ja nuorilla täysikasvuisilla eläimillä (SJP 60 ja vanhempi). Kun testi suoritetaan vieroituksen aikana, ks. 32 kohta. Samaa tai eri testiä (testejä) voidaan käyttää näissä kahdessa kehitysvaiheessa. Vastavieroitettujen ja täysikasvuisten rottien oppimista ja muistia koskevien testien valinnan osalta sallitaan jonkin verran joustavuutta. Testit olisi kuitenkin suunniteltava siten, että täytetään kaksi kriteeriä. Ensinnäkin oppimista olisi arvioitava joko usean toistetun oppimista mittaavaan kokeen tai jakson kuluessa tapahtuneena muutoksena tai yhdestä kokeesta muodostuvissa testeissä, kun kyseessä on olosuhde, joka ohjaa oppimisen ei-assosiatiivisia vaikutuksia. Toiseksi testiin (testeihin) pitäisi sisältyä jonkinlainen (lyhytaikaisen tai pitkäaikaisen) muistin mittaaminen alkuperäisen oppimisen (oppimistuloksen) lisäksi, mutta muistin mittaamista ei voida raportoida, jos samasta testistä saadut oppimistuloksen mittaamistoimet puuttuvat. Jos oppimista ja muistia koskeva yksi tai useampi testi osoittaa testikemikaalin vaikutuksen, voidaan harkita täydentäviä testejä, joilla suljetaan pois sensoristen, motivationaalisten ja/tai motoristen valmiuksien muutoksiin perustuvat vaihtoehtoiset tulkinnat. Edellisen kahden kriteerin lisäksi suositellaan, että oppimista ja muistia mittaava testi valitaan sen perusteella, miten sen herkkyys osoitetaan tarkasteltavan kemikaalin luokan perusteella, jos tällaisia tietoja on saatavilla lähteissä. Jos tietoja ei ole, seuraavassa on esimerkkejä testeistä, joita voidaan tehdä edellä mainittujen kriteerien täyttämiseksi: passiivinen välttäminen (43)(56)(57), viivästynyt asettuminen asentoon (delayed-matching-to-position), kun kyseessä ovat täysikasvuiset rotat (58) ja kun kyseessä on imeväisikäinen rotta (59), hajuihin totuttaminen (43)(60), Morrisin vesisokkelo (61)(62)(63), Bielin tai Cincinnatin sokkelo (64)(65), säteittäinen sokkelo (66), T-sokkelo (43) ja aikataululla valvotun käytöksen omaksuminen ja säilyttäminen (26)(67)(68). Täydentäviä testejä kuvataan vastavieroitettuja (26)(27) ja täysikasvuisia rottia (19)(20) koskevissa lähteissä.

Post mortem -tutkimus

38. Emot voidaan lopettaa poikasten vieroituksen jälkeen.

39. Poikasten neuropatologinen arviointi suoritetaan käyttäen kudoksia, jotka ovat peräisin eläimiltä, jotka lopetetaan inhimillisesti syntymän jälkeisenä päivänä 22 tai aikaisemmin syntymän jälkeisenä päivänä 11–22 taikka tutkimuksen loppuvaiheessa. SJP 22:een mennessä lopetettujen poikasten aivokudoksia olisi arvioitava; testin loppuvaiheessa lopetettujen eläinten keskushermoston kudoksia ja ääreishermoston kudoksia olisi arvioitava. SJP 22:een mennessä lopetettujen eläinten näytteet voidaan fiksoida upottamis- tai perfuusiotekniikalla. Tutkimuksen loppuvaiheessa lopetettujen eläinten näytteet olisi fiksoitava perfuusion avulla. Kaikissa kudosnäytteiden fiksointia koskevissa toimenpiteissä eläinten perfuusiosta kudosnäytteiden dissektioon, kudosten käsittelyyn ja objektilasien värjäykseen olisi käytettävä sellaista tasapainottavaa mallia, että jokaiseen erään sisältyy edustavia näytteitä kustakin annosryhmästä. Lisäohjeita neuropatologiasta sisältyy OECD:n ohjeasiakirjaan 20 (9), ks. myös (103).

Kudosnäytteiden käsittely

40. Kaikki ruumiinavauksessa paljain silmin havaittavat poikkeavuudet on kirjattava. Otettujen kudosnäytteiden on katettava kaikki keskeiset hermoston alueet. Kudosnäytteet olisi säilytettävä sopivassa kiinnitysaineessa ja niitä olisi käsiteltävä julkaistujen standardimuotoisten histologisten menettelyjen mukaisesti (69)(70)(71)(103). Parafiinivalun käyttö on hyväksyttävää keskushermoston kudoksien ja ääreishermoston kudoksien osalta, mutta osmiumin käyttö fiksoinnin jälkeen yhdessä epoksivalun kanssa voi olla asianmukaista, kun tarvitaan suurempaa resoluutiota (esim. ääreishermoja varten, kun epäillään perifeeristä neuropatiaa, ja/tai ääreishermojen morfometrista analyysia

varten). Morfometrista analyysia varten kerätty aivokudos olisi valettava sopivaan aineeseen kaikilla annostasoilla samaan aikaan. Näin vältetään kutistuneet artefaktit, jotka voivat liittyä pitkäaikaiseen säilytykseen fiksatiivissa (6).

Neuropatologinen tutkimus

41. Kvalitatiivisen tutkimuksen tavoitteena on:

i) täsmentää hermoston alueet, joilla esiintyy todisteita neuropatologisista muutoksista,

ii) täsmentää testiaineelle altistumisesta johtuvien neuropatologisten muutosten tyypit, ja

iii) määrittää neuropatologisten muutosten vakavuus.

Asianmukaisesti koulutettu patologi tutkii kudosnäytteistä otettuja edustavia histologisia leikkeitä mikroskoopilla neuropatologisia muutoksia koskevista todisteista. Kaikille neuropatologisille muutoksille olisi annettava yksilöllinen luokka, joka osoittaa muutoksen vakavuuden. Hekatoksyliini ja eosiiniväri voi olla riittävä inhimillisesti lopetettujen eläinten aivojen leikkeiden arviointia varten syntymän jälkeisenä päivänä 22 tai sitä ennen. Tutkimuksen loppuvaiheessa lopetettujen eläinten keskushermoston ja ääreishermoston kudosten leikkeille suositellaan kuitenkin myeliinivärjäystä (esim. luxol fast blue/cresyl violet) ja hopeavärjäystä (kuten Bielschowskyn tai Bodianin värjäys). Patologin ammatillisen harkinnan ja havaittujen muutosten tyypin perusteella muunlaisia värjäystekniikoita voidaan pitää asianmukaisena tietyntyyppisten muutosten tunnistamiseksi ja kuvaamiseksi (kuten GFAP-värjäys (gliaalinen fibrillaarinen hapan proteiini) tai lektiinihistokemia gliaalisten ja mikrogliaalisten muutosten arvioimiseksi (72), fluoro-jade -liuoksella värjääminen nekroosin havaitsemiseksi (73)(74), tai hermosolujen rappeutumiselle spesifiset hopeavärjäykset (75)).

42. Morfometrinen (kvantitatiivinen) arviointi olisi suoritettava, koska näillä tiedoilla voidaan auttaa havaitsemaan testeihin liittyvä vaikutus ja koska ne ovat hyödyllisiä tulkittaessa testeihin liittyviä aivojen painoa koskevia tai morfologisia muutoksia (76)(77). Hermokudoksesta olisi otettava näyte ja se olisi preparoitava morfometrista arviointia varten. Morfometrisiin arviointeihin voi sisältyä esim. aivojen tiettyjen alueiden lineaarinen tai areaalinen mittaaminen (78). Lineaarisiin tai areaalisiin mittauksiin on käytettävä homologisia leikkeitä, jotka on valittu tarkasti luotettavien mikroskooppisten tuntomerkkien perusteella (6). Stereologiaa voidaan käyttää täsmentämään käsittelyyn liittyvät vaikutukset, jotka kohdistuvat parametreihin, kuten erityisten neuroanatomisten alueiden volyymi tai solumäärä (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Aivot olisi tutkittava, jotta todisteet käsittelyyn liittyvistä neuropatologista muutoksista havaitaan, ja kaikista aivojen tärkeimmistä alueista (kuten hajukäämit, aivokuori, hippokampus, tyvitumakkeet, talamus, hypotalamus, keskiaivot (keskiaivojen katto, keskiaivojen peite ja pikkuaivovarret), aivosilta, ydinjatke, pikkuaivot) olisi otettava riittävät näytteet. Näin varmistetaan perusteellinen tutkimus. On tärkeää, että kaikkien eläinten leikkeet otetaan samasta tasosta. Tutkimuksen lopussa inhimillisesti lopetetuilta täysikasvuisilta eläimiltä olisi otettava näytteeksi selkäytimen ja ääreishermoston edustavat leikkeet. Tarkasteltaviin alueisiin olisi kuuluttava silmä, näköhermo ja verkkokalvo mukaan lukien, selkäydin kaularangan ja lannerangan kohdalta, taka- ja etujuuren hermosäikeet, proksimaalinen lonkkahermo, proksimaalinen säärihermo (polven kohdalta) ja säärihermon puoleiset pohjelihaksen haarat. Selkäytimestä ja ääreishermostosta on tehtävä poikittais- ja pitkittäisleikkeet.

44. Neuropatologisessa arvioinnissa tarkastellaan, onko hermostolle aiheutuneista kehityshäiriöistä viitteitä (6)(85)(86)(87)(88)(89) solumuutoksien (esim. hermosolujen vakuolisaatio, rappeuma, kuolio) ja kudosmuutoksien (esim. glioosi, leukosyyttien infiltraatio, kystien muodostuminen) lisäksi. Tältä osin on tärkeää, että käsittelyyn liittyvät vaikutukset erotetaan normaalista kehityksestä, jonka tiedetään tapahtuvan lopetusajankohtaa vastaavassa kehitysvaiheessa (90). Esimerkkeihin merkittävistä muutoksista, jotka viittaavat kehitysvaurioihin, sisältyvät mutta eivät pelkästään:

— hajukäämien, aivojen tai pikkuaivojen kokonaiskoon tai muodon muutokset

— aivojen eri alueiden suhteellisen koon muutokset, mukaan lukien alueiden koon pienentyminen tai suurentuminen, joka aiheutuu normaalisti tilapäisten solupopulaatioiden menettämisestä tai pysyvyydestä taikka aksonaalisesta kuljetuksesta (esim. pikkuaivojen ulompi jyvässolukerros, aivokurkiainen)

— muutokset solun jakaantumisessa, liikkumisessa ja erilaistumisessa, mitä osoittavat liiallinen apoptoosi tai kuolio, klusterit tai hajallaan olevat populaatiot ektooppisia, disorientoituneita tai epämuodostuneita neuroneja, taikka muutokset aivokuoren rakenteiden eri kerrosten suhteellisessa koossa

— hermosolujen myeliinin kehittymisen muutokset mukaan lukien yleinen koon pienentyminen tai myelinoitujen rakenteiden muuttunut värjäys

— todisteet vesipäästä, erityisesti aivokammion laajentuminen, aivonesteviemärin ahtauma ja aivopuoliskojen ohentuminen.

Neuropatologisten muutosten annosvasteiden suhteen analyysi

45. Seuraavaa asteittaista menetelmää suositellaan kvalitatiivisia ja kvantitatiivisia neuropatologisia analyysejä varten. Ensinnäkin korkean annostason ryhmästä otettuja leikkeitä verrataan kontrolliryhmän leikkeisiin. Jos korkean annostason eläinten ryhmässä ei havaita neuropatologisia muutoksia, myöhempää analyysiä ei tarvita. Jos korkean annoksen ryhmässä havaitaan neuropatologisia muutoksia, keskisuuren ja pienen annoksen ryhmän eläimet tutkitaan. Jos korkean annoksen ryhmä tulee päätekohtaan kuoleman tai muun häiritsevän toksisuuden vuoksi, korkean annoksen ja keskisuuren annoksen ryhmiä olisi analysoitava neuropatologisista muutoksista. Jos pienemmän annoksen ryhmissä havaitaan neurotoksisuutta, niissä olisi tehtävä neuropatologinen analyysi. Jos käsittelyyn liittyviä neuropatologisia muutoksia havaitaan kvalitatiivisessa tai kvantitatiivisessa tutkimuksessa, esiintyvyyden annosriippuvuus, vaurioiden tai morfometristen muutosten esiintyvyys ja vakavuus määritellään kaikista annosryhmistä peräisin olevien eläinten arvioinnin perusteella. Kaikki alueet aivoissa, joissa havaitaan todisteita neuropatologisista muutoksista, olisi sisällytettävä tähän arviointiin. Jokaisen vauriotyypin osalta kunkin vakavuusasteen määrittelyyn käytetyt ominaispiirteet olisi määriteltävä, ja niissä olisi ilmoitettava yksityiskohdat, joita käytetään kunkin luokan erottamiseen. Kunkin vauriotyypin osalta sen yleisyys ja vakavuusaste olisi kirjattava ja olisi tehtävä tilastollinen analyysi annos-vastesuhteen luonteen arvioimiseksi. Koodattujen objektilasien käyttöä suositellaan (91).

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

46. Tiedot olisi ilmoitettava erikseen ja esitettävä taulukkomuodossa, josta ilmenevät kunkin testiryhmän osalta muutostyypit, emojen ja poikasten määrä sukupuolittain sekä poikueiden määrä kutakin muutosta kohti. Jos poikasten syntymän jälkeinen suora altistaminen on suoritettu, olisi ilmoitettava altistusreitti, kesto ja altistusajankohta.

Tulosten arviointi ja tulkinta

47. Tutkimuksessa hermostonkehitykseen kohdistuvista myrkyllisyysvaikutuksista tarjotaan tietoja toistuvasta altistumisesta kemikaalille kohdussa ja vastasyntyneen kehitysvaiheessa. Koska tutkimuksessa painotetaan yleisten ja hermostonkehitykseen vaikuttavien myrkyllisyysvaikutusten päätetapahtumia, tutkimustulosten perusteella voidaan jossain määrin erotella toisaalta ne hermoston kehitykseen kohdistuvat vaikutukset, joiden osalta emoilla ei ilmene myrkyllisyysvaikutuksia, sekä toisaalta ne vaikutukset, jotka ilmenevät ainoastaan tasoilla, jotka ovat myrkyllisiä myös emoille. Tutkimussuunnitelman, tilastoanalyysin ja tietojen biologisen merkitsevyyden välisten monimutkaisten yhteyksien vuoksi asiantuntijan on tulkittava asianmukaisesti tietoja hermostonkehitykseen kohdistuvista myrkyllisyysvaikutuksista (107)(109). Testitulosten tulkintaan olisi käytettävä painoarvoanalyysiä (20)(92)(93)(94). Käytöstä koskevia tai morfologisia löydöksiä, jos niitä on, sekä annosvasteita koskevaa näyttöä olisi käsiteltävä. Tähän olisi sisällyttävä tiedot kaikista tutkimuksista, jotka koskevat hermostonkehitykseen vaikuttavia myrkyllisyysvaikutuksia, mukaan lukien ihmisen epidemiologiset tutkimukset tai tapausselostukset ja eläimillä tehdyt kokeet (esim. toksikokineettiset tiedot, rakenne-aktiivisuustiedot, tiedot muista toksisuustutkimuksista). Tähän sisältyy testikemikaalin annosten välinen suhde ja kaikkien neurotoksisten vaikutusten olemassaolo tai puuttuminen, esiintyvyys ja laajuus kummankin sukupuolen osalta (20)(95).

48. Tietojen arviointiin pitäisi sisältyä pohdinta biologisesta ja tilastollisesta merkittävyydestä. Tilastoanalyysiä olisi pidettävä välineenä, joka ohjaa tietojen tulkintaa sen sijaan, että se määrittää sitä. Tilastollisen merkittävyyden puute ei saisi olla ainoa peruste päätelmälle siitä, että altistusvaikutus puuttuu, ja tilastollinen merkittävyys ei saisi olla ainoa peruste tehdä päätelmä altistusvaikutuksesta. Jotta mahdollisia vääriä negatiivisia havaintoja ei esitettäisi ja negatiivisilla kontrolleilla saatujen tulosten todistamiseen liittyvät hankaluudet vältettäisiin, olisi käsiteltävä käytettävissä olevia positiivisia ja aikaisempia kontrollitutkimuksien tietoja erityisesti, jos mitään altistukseen liittyviä vaikutuksia ei esiinny (102)(106). Väärien positiivisten löydöksien mahdollisuutta olisi pohdittava tietojen kaikkien tilastollisten arvioiden pohjalta (96). Arviointiin pitäisi sisältyä havaittujen neuropatologisten ja käyttäytymiseen liittyvien muutosten välinen mahdollinen suhde.

49. Kaikkia tuloksia olisi analysoitava käyttämällä koesuunnittelun kannalta asianmukaisimpia tilastollisia malleja (108). Parametrisen tai ei-parametrisen analyysin valintaa olisi perusteltava ottaen huomioon esimerkiksi tietojen laatu (onko niitä muunneltu) ja niiden jakelu sekä valitun tilastoanalyysin suhteellinen luotettavuus. Tutkimuksen tarkoituksen ja suunnittelun pitäisi ohjata tilastoanalyysien valintaa tyypin I (väärä positiivinen) ja tyypin II (väärä negatiivinen) virheiden vähimmäistämiseksi (96)(97)(104)(105). Hermostonkehitystä koskevissa tutkimuksissa, joissa käytetään useita poikasia kerrallaan synnyttäviä lajeja, joiden poikueesta testataan useita poikasia, poikue olisi sisällytettävä tilastolliseen malliin. Tarkoitus on välttää lisäämästä tyypin I virheiden määrää (98)(99)(100)(101). Tilastollisen mittayksikön pitäisi olla poikue, ei poikanen. Kokeet olisi suunniteltava siten, että samaan poikueeseen kuuluvia poikasia ei käsitellä erillisten havaintojen tavoin. Kaikkia päätetapahtumia, joita mitataan toistuvasti samalla kohteella, olisi analysoitava käyttämällä tilastollisia malleja, joissa otetaan huomioon, että kyseiset toimenpiteet eivät ole toisistaan riippuvaisia.

Tutkimusseloste

50. Tutkimusselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet

— tunnistetiedot, mukaan lukien lähde

— valmisteen puhtaus ja tunnetut ja/tai oletetut epäpuhtaudet.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— perusteet kantaja-aineen valinnalle, jos se on muu kuin vesi tai fysiologinen keittosuolaliuos.

Koe-eläinlajit:

— käytetty eläinlaji ja kanta sekä perustelu, jos se on muu kuin rotta

— koe-eläinten toimittaja

— eläinten lukumäärä, ikä testin alussa ja sukupuoli

— toimittaja, häkit, ravinto, vesi ja niin edelleen

— kunkin eläimen paino testin alussa.

Testiolosuhteet:

— annostasojen valintaperusteet

— annostelureittiä ja ajankohtaa koskevat valintaperusteet

— selvitys annetuista annoksista, mukaan lukien selonteko kantaja-aineesta sekä annostellun aineen määrästä ja fysikaalisesta olomuodosta

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta/ravintovalmisteesta, saavutetusta pitoisuudesta, stabiiliudesta ja tasalaatuisuudesta

— emojen ja poikasten yksilölliseen tunnistamiseen käytetty menetelmä

— yksityiskohtainen kuvaus satunnaisottoa koskevasta menettelystä (menettelyistä), jota sovelletaan, kun emoja valitaan koeryhmiin, poikasia karsitaan ja ne jaetaan testiryhmiin

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin antotavasta

— ravintoon/juomaveteen sekoitetun hengitysteiden altistukseen liittyvän testin testikemikaalin pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg/painokilo/vrk) tarvittaessa

— ympäristöolosuhteet

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden (esim. hanavesi, tislattu vesi) laadusta

— testin alku- ja päättymispäivä.

Havainnointi ja testausmenetelmät:

— yksityiskohtainen kuvaus menettelyistä, joita käytetään standardoimaan havainnot ja menettelyt sekä operatiiviset määritelmät pisteytykseen liittyville havainnoille

— luettelo kaikista käytetyistä testimenettelyistä ja perustelut niiden käytölle

— yksityiskohtaiset tiedot sovelletuista käyttäytymiseen/toimintaan liittyvistä, patologisista, neurokemiallisista ja sähköfysiologisista menettelyistä mukaan lukien yksityiskohtaiset tiedot automaattilaitteista

— laitteiden kalibrointia ja niiden vastaavuuden varmistamista koskevat menetelmät sekä koeryhmien tasapainottaminen testausmenettelyissä

— lyhyt perustelu, jossa selvitetään päätöksiä, joihin liittyy asiantuntija-arvio.

Tulokset (yksittäiset ja yhteenveto, mukaan lukien tarvittaessa keskiarvo ja varianssi):

— eläinten lukumäärä tutkimuksen alussa ja tutkimuksen lopussa

— kutakin testimenetelmää varten käytettyjen eläinten ja poikueiden määrä

— kunkin eläimen tunnistenumero ja poikue, josta se on peräisin

— poikueen koko ja keskimääräinen syntymäpaino sukupuolittain eroteltuna

— ruumiinpainoa ja sen muutoksia koskevat tiedot, mukaan lukien emon ja poikasten ruumiinpaino lopetettaessa

— ravinnon ja tarvittaessa veden kulutus (esim. jos testikemikaalia annostellaan veden kautta)

— toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason perusteella, mukaan lukien toksisuusoireet tai kuolleisuus, ja tarvittaessa kuolinaika ja -syy

— yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste, kesto, oireiden alku, ajankohta ja myöhempi kehitys

— kunkin kehitystä koskevan päätetapahtuman tilanne (paino, sukukypsyys ja käytöksen kehitys) kunakin havainnointiaikana

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista hermostoperäisiin käyttäytymisoireisiin liittyvistä, toiminnallisista, neuropatologisista, neurokemiallista tai sähköfysiologisista löydöksistä sukupuolen perusteella, mukaan lukien niiden lisääntyminen ja vähentyminen kontrollitietojen perusteella

— ruumiinavauslöydökset

— aivojen paino

— havainnot hermostollisista oireista tai vaurioista mukaan lukien luonnollisesti esiintyvät sairaudet tai tilat

— kuvat esimerkkilöydöksistä

— morfometriassa käytettyjen leikkeiden homologian arviointiin käytetyt vähän tehoa kuluttavat kuvat

— tiedot absorboitumisesta ja metaboloitumisesta, mukaan lukien täydentävät tiedot erillisestä toksikokineettisestä tutkimuksesta, mikäli saatavissa

— tulosten tilastollinen käsittely, mukaan lukien tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset mallit ja tulokset riippumatta siitä, olivatko ne merkittävät

— luettelo tutkimushenkilöstöstä, mukaan lukien ammatillinen koulutus.

Tulosten tarkastelu:

— annos-vaste-tulokset sukupuolen ja ryhmän mukaan

— kaikkien muiden myrkyllisyysvaikutusten suhde testikemikaalin mahdollisesta neurotoksisuudesta tehtyihin johtopäätöksiin sukupuolen ja ryhmän perusteella

— toksikokineettisten tietojen vaikutus päätelmiin

— vaikutukset, jotka ovat samankaltaisia tunnettujen neurotoksisten aineiden kanssa

— testimenettelyn luotettavuutta ja herkkyyttä tukevat tiedot (kuten positiiviset ja aikaisemmat kontrollitiedot)

— mahdolliset suhteet neuropatologisten ja toiminnallisten vaikutusten välillä

— haitaton tai vertailukohtana oleva annos emoille ja poikasille sukupuolen ja ryhmän perusteella.

Päätelmät:

— pohdinta tietojen yleisestä tulkinnasta tulosten perusteella, mukaan lukien johtopäätös siitä, aiheuttiko testikemikaali hermostonkehitykseen vaikuttavia myrkyllisyysvaikutuksia, ja haitattomasta vaikutustasosta.

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13–14 June 1995.

(2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Available: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

(3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Available: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79–91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101–111.

(6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93–100.

(7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.

(8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Saatavilla sivustolla: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en].

(9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Saatavilla sivustolla: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

(10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173–292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition,* ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

(12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188–197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition,* ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

(14) Tämän liitteen B.34 luku 'Myrkkyjen vaikutus lisääntymiskykyyn (yhden sukupolven testi)'.

(15) Tämän liitteen B.35 luku 'Kaksi sukupolvea käsittävä lisääntymiskykyyn kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten tutkimus'.

(16) Tämän liitteen B.43 luku 'Neurotoksisuustutkimus jyrsijöillä'.

(17) Tämän liitteen B.31 luku 'Prenataalisen kehityksen aikaisten myrkyllisyysvaikutusten tutkimus'.

(18) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta (EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33).

(19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Available: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

(20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Saatavilla: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

(22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499–509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2–6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110–112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118–136.

(26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

(29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87–94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1–4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433–439.

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449–457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383–390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350–365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579–586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298–303.

(38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489–95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896–920.

(40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, s. 67–100.

(41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53–66.

(42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, s. 37–82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3′-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117–129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247–260.

(45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599–609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405–411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64:661–669.

(48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589–591.

(49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, s. 287–351

(50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107–128.

(51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *TARGET Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, s. 181–211.

(52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199–211.

(53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80:25–30.

(54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *TARGET Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. s. 125–145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3′-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321–332.

(57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247–296.

(58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237–244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98–105.

(60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465–479.

(61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47–60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29–69.

(63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60–90.

(64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235–241.

(65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387–399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327–332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342–352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338–341.

(69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122–131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, s. 84–107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291–304.

(73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123–130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365–372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545–561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745–755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417–432.

(78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129–135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305–310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262–268.

(82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707–710.

(83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51–61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813–831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113–121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294–298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, s. 3–41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70–74.

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127–133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401–405.

(93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

(94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274–56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113–126.

(97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21–27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329–335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165–172.

(100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221–228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587–90.

(102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345–352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. Toxicol. Pathol. 34:296–313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205–210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295–301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):266–287.

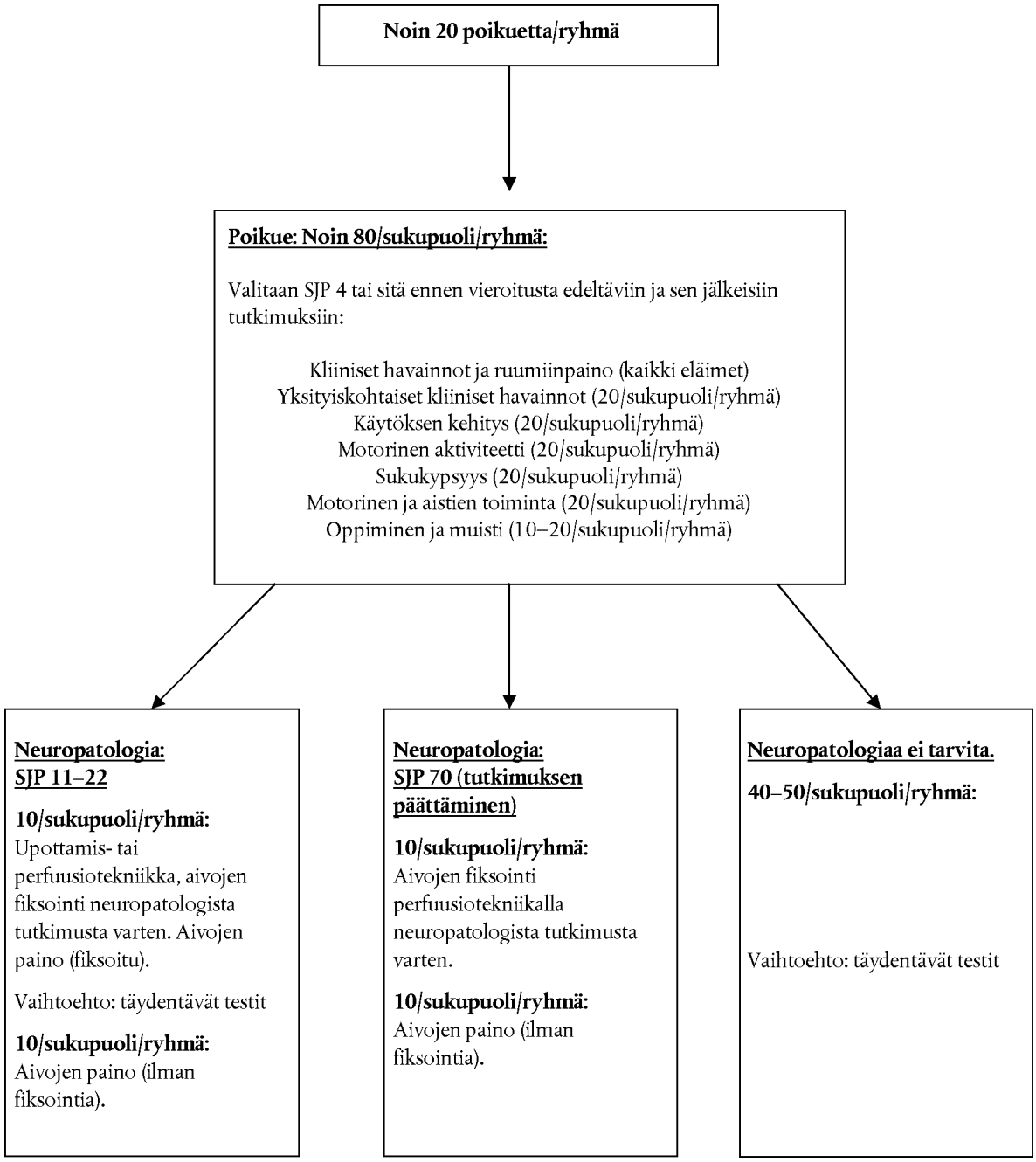
(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):288–325.

(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):326–348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):349–381.

Kuva 1

Toimintaan/käyttäytymisoireisiin liittyviä testejä, neuropatologista arviointia ja aivojen painoa koskeva yleinen testausjärjestelmä. Tämä kaavio perustuu 13–15 kohdan kuvaukseen (SJP = syntymän jälkeinen päivä). Eläinten valintaa koskevia esimerkkejä annetaan liitteessä 1



Lisäys 1

1. Esimerkkejä eläinten mahdollisista jakamistavoista kuvataan ja esitetään taulukossa jäljempänä. Näillä esimerkeillä kuvataan sitä, että koe-eläinten valinta eri testimalleihin voidaan toteuttaa eri tavoin.

Esimerkki 1

2. Yhtä ryhmää — 20 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään käytöksen kehitystä koskevaan vieroitusta edeltävään testiin. Näistä eläimistä 10 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) lopetetaan inhimillisesti syntymän jälkeisenä päivänä 22. Aivot poistetaan, punnitaan ja käsitellään histopatologisessa tutkimuksessa. Lisäksi aivojen painoja koskevat tiedot kerätään käyttämällä jäljelle jääneiden 10 uroksen ja 10 naaraan irrotettuja aivoja annostasoa kohti.

3. Toista ryhmää — 20 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään toimintaa/käyttäytymistä koskevaan vieroituksen jälkeiseen testiin (yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen, motorisen aktiviteetin, akustisen säpsähdysvasteen ja kognitiivisen toiminnan testaaminen kasvuikäisten eläinten osalta) ja sukukypsyysiän arviointiin. Näistä 10 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) nukutetaan ja fiksoidaan perfuusiotekniikalla tutkimuksen päätösvaiheessa (arviolta syntymän jälkeinen päivä 70). Uuden fiksaation *in situ* jälkeen aivot poistetaan ja käsitellään neuropatologisessa tutkimuksessa.

4. Nuorten täysikasvuisten eläinten (esim. syntymän jälkeinen päivä 60–70) kognitiivisen toiminnan testaukseen käytetään kolmatta ryhmää, jossa on 20 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti). Näistä 10 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) lopetetaan tutkimuksen päättyessä ja aivot poistetaan ja punnitaan.

5. Jäljelle jääneet 20 eläintä/sukupuoli/ryhmä varataan mahdollisia täydentäviä kokeita varten.

Taulukko 1

Poikasten määrä [a]		Kokeisiin valittujen poikasten määrä	Tutkimus/Testi
uros	naaras		
1	5	20 urosta + 20 naarasta	Käytöksen kehitys
		10 urosta + 10 naarasta	SJP 22 aivojen paino/neuropatologia/morfometria
		10 urosta + 10 naarasta	SJP 22 aivojen paino
2	6	20 urosta + 20 naarasta	Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot
		20 urosta + 20 naarasta	Motorinen aktiviteetti
		20 urosta + 20 naarasta	Sukukypsyys
		20 urosta + 20 naarasta	Motorinen ja aistien toiminta
		20 urosta + 20 naarasta	Oppiminen ja muisti (SJP 25)
		10 urosta + 10 naarasta	Nuoren täysikasvuisen yksilön aivojen paino/neuropatologia/morfometria ~ SJP 70
3	7	20 urosta + 20 naarasta	Oppiminen ja muisti (nuoret täysikasvuiset eläimet)
		10 urosta + 10 naarasta	Nuorten täysikasvuisten eläinten aivojen paino ~ SJP 70
4	8	—	Varalla olevat eläimet poikasten korvaamista tai täydentäviä kokeita varten

[a] Tässä esimerkissä poikueet karsitaan 4 urokseen + 4 naaraaseen; urospuoliset poikaset numeroidaan yhdestä neljään ja naaraspuoliset poikaset viidestä kahdeksaan.

Esimerkki 2

6. Yhtä ryhmää — 20 poikasta/sukupuoli/annostasoa (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään käytöksen kehitystä koskevaan vieroitusta edeltävään testiin. Näistä eläimistä 10 pentua/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai yksi naaras poikuetta kohti) lopetetaan inhimillisesti syntymän jälkeisenä päivänä 11. Aivot poistetaan, punnitaan ja käsitellään histopatologisessa tutkimuksessa.

7. Toista ryhmää — 20 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään vieroituksen jälkeisiin testeihin (yksityiskohtaisten kliinisten havaintojen, motorisen aktiviteetin ja sukukypsyysiän sekä motorisen ja aistien toiminnan arviointi). Näistä 10 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai yksi naaras poikuetta kohti) nukutetaan ja fiksoidaan perfuusiotekniikalla tutkimuksen päätösvaiheessa (arviolta syntymän jälkeinen päivä 70). Uuden fiksaation *in situ* jälkeen aivot poistetaan, punnitaan ja käsitellään neuropatologisessa tutkimuksessa.

8. Kasvuikäisten ja nuorten täysikasvuisten kognitiivisen toiminnan testaukseen käytetään 10 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai 1 naaras poikuetta kohti). Eri eläimiä käytetään, kun kognitiivista toimintaa testataan syntymisen jälkeisenä päivänä 23 ja nuorilla täysikasvuisilla eläimillä. Täysikasvuisena testatut 10 eläintä/sukupuoli/annostaso lopetetaan tutkimuksen päätösvaiheessa, niiden aivot poistetaan ja punnitaan.

9. Jäljelle jääneet 20 eläintä/sukupuoli/ryhmä, joita ei valittu kokeisiin, lopetetaan ja poistetaan vieroituksen yhteydessä.

Taulukko 2

Poikasten määrä [a]		Kokeisiin valittujen poikasten määrä	Tutkimus/Testi
uros	naaras		
1	5	20 urosta + 20 naarasta	Käytöksen kehitys
		10 urosta + 10 naarasta	SJP 11 aivojen paino/neuropatologia/morfometria
2	6	20 urosta + 20 naarasta	Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot
		20 urosta + 20 naarasta	Motorinen aktiviteetti
		20 urosta + 20 naarasta	Sukukypsyys
		20 urosta + 20 naarasta	Motorinen ja aistien toiminta
		10 urosta + 10 naarasta	Nuoren täysikasvuisen yksilön aivojen paino/neuropatologia/morfometria ~ SJP 70
3	7	10 urosta + 10 naarasta [b]	Oppiminen ja muisti (SJP 23)
3	7	10 urosta + 10 naarasta [b]	Oppiminen ja muisti (nuoret täysikasvuiset eläimet)
			Nuorten täysikasvuisten eläinten aivojen paino
4	8	—	Eläimet, jotka lopetetaan ja poistetaan syntymän jälkeisenä päivänä 21.

[a] Tässä esimerkissä poikueet karsitaan 4 urokseen + 4 naaraaseen; urospuoliset poikaset numeroidaan yhdestä neljään ja naaraspuoliset poikaset viidestä kahdeksaan.

[b] Eri poikasia käytetään kognitiiviseen testiin syntymän jälkeisenä päivänä 23 ja nuorten täysikasvuisten keskuudessa (esim. parilliset/parittomat poikueet yhteensä 20:sta).

Esimerkki 3

10. Yhtä ryhmää — 20 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään aivojen painon arviointiin ja neuropatologiseen arviointiin syntymän jälkeisenä päivänä 11. Näistä eläimistä 10 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai 1 naaras poikuetta kohti) lopetetaan inhimillisellä tavalla syntymän jälkeisenä päivänä 11 ja niiden aivot poistetaan, punnitaan ja käsitellään histopatologisessa tutkimuksessa. Lisäksi aivojen painoja koskevat tiedot kerätään käyttämällä jäljelle jääneiden 10 uroksen ja 10 naaraan irrotettuja aivoja annostasoa kohden.

11. Toista ryhmää — 20 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään käytöksen kehitystä (motorista aktiviteettia) koskeviin vieroituksen jälkeisiin kokeisiin (motorinen aktiviteetti ja sukukypsyysiän arviointi) sekä kasvuikäisten eläinten kognitiivisen toiminnan testaukseen.

12. Lisäksi toista ryhmää — 20 pentua/sukupuoli/annostasoa (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti) — käytetään motorista ja aistien toimintaa koskeviin kokeisiin (akustinen säpsähdysvaste) sekä yksityiskohtaisia kliinisiä havaintoja varten. Näistä 10 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai yksi naaras poikuetta kohti) nukutetaan ja fiksoidaan perfuusiotekniikalla tutkimuksen päätösvaiheessa (arviolta syntymän jälkeinen päivä 70). Uuden fiksaation *in situ* jälkeen aivot poistetaan, punnitaan ja käsitellään neuropatologisessa tutkimuksessa.

13. Kasvuikäisten ja nuorten täysikasvuisten kognitiivisen toiminnan testaukseen käytetään 20 poikasta/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros ja 1 naaras poikuetta kohti). Näistä 10 eläintä/sukupuoli/annostaso (eli 1 uros tai yksi naaras poikuetta kohti) lopetetaan tutkimuksen päättyessä ja niiden aivot poistetaan ja punnitaan.

Taulukko 3

Poikasten määrä [a]		Kokeisiin valittujen poikasten määrä	Tutkimus/Testi
uros	naaras		
1	5	10 urosta + 10 naarasta	SJP 11 aivojen paino/neuropatologia/morfometria
		10 urosta + 10 naarasta	SJP 11 aivojen paino
2	6	20 urosta + 20 naarasta	Käytöksen kehitys (motorinen aktiviteetti)
		20 urosta + 20 naarasta	Motorinen aktiviteetti
		20 urosta + 20 naarasta	Sukukypsyys
		20 urosta + 20 naarasta	Oppiminen ja muisti (SJP 27)
3	7	20 urosta + 20 naarasta	Akustinen säpsähdysvaste (kasvuikäiset ja nuoret täysikasvuiset eläimet)
		20 urosta + 20 naarasta	Yksityiskohtaiset kliiniset havainnot
		10 urosta + 10 naarasta	Nuorten täysikasvuisten eläinten aivojen paino/neuropatologia morfometria ~ SJP 70
4	8	20 urosta + 20 naarasta	Oppiminen ja muisti (nuoret täysikasvuiset eläimet)
		10 urosta + 10 naarasta	Nuorten täysikasvuisten eläinten aivojen paino

[a] Tässä esimerkissä poikueet karsitaan 4 urokseen + 4 naaraaseen; urospuoliset poikaset numeroidaan yhdestä neljään ja naaraspuoliset poikaset viidestä kahdeksaan.

Lisäys 2

Määritelmät

Kemikaali: aine tai seos

Testattava kemikaali: mikä tahansa aine tai seos, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää

B.54. KOHTUUN AIHEUTUVIEN VAIKUTUKSIEN BIOTESTI JYRSIJÖILLÄ: LYHYTAIKAINEN SEULONTATESTI ESTROGEENISISTA OMINAISUUKSISTA

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 440 (2007). OECD aloitti vuonna 1998 korkean prioriteetin toimenpiteet, jotta voimassa olevia ohjeita tarkistetaan ja kehitetään uusia, joilla mahdollisia hormonaalisia haitta-aiheita seulotaan ja testataan (1). Yksi toimenpide oli kehittää testiohje jyrsijöiden kohtuun aiheutuvia vaikutuksia koskevalle biotestille. Jyrsijöiden kohtuun aiheutuvia vaikutuksia koskevan biotestin osalta toteutettiin kattava validointiohjelma, johon sisältyi yksityiskohtaisten tausta-asiakirjojen kerääminen (2)(3) ja sellaisten laajojen laboratorioiden sisäisten ja niiden välisten tutkimusten teettäminen, joilla osoitettiin biotestin merkitys ja toistettavuus, kun kyseessä on tehokas referenssiestrogeeni, heikot estrogeenireseptorin agonistit, voimakas estrogeenireseptorin antagonisti ja negatiivinen vertailukemikaali (4)(5)(6)(7)(8)(9). Tämä testimenetelmä B.54 on tulos validointiohjelmassa saadusta kokemuksesta ja tuloksista, joita sen perusteella saatiin agonisteista, joilla on estrogeenisia ominaisuuksia.

2. Kohtuun aiheutuvia vaikutuksia koskeva biotesti on lyhytaikainen seulontatesti, joka kehitettiin 1930-luvulla (27)(28) ja jonka asiantuntijaryhmä standardoi ensimmäisen kerran seulontaa varten vuonna 1962 (32)(35). Se perustuu kohdun painon lisääntymiseen tai uterotrofiseen reaktioon (ks. yksityiskohtia varten (29)). Testissä arvioidaan kemikaalin kykyä käynnistää biologista toimintaa, joka on yhdenmukainen luonnollisten estrogeenien (esim. 17ß-estradioli) ominaisuuksia omaavien agonistien tai antagonistien kanssa. Sitä käytetään kuitenkin antagonistin havaitsemiseen paljon harvemmin kuin agonistin havaitsemiseen. Kohtu reagoi estrogeeneihin kahdella tavalla. Ensimmäinen vaste on painonnousu veden imeytymisen vuoksi. Tätä vastetta seuraa kudosten kasvusta aiheutuva painonnousu (30). Kohdun vasteet rotilla ja hiirillä ovat laadullisesti vertailukelpoiset.

3. Tämä biotesti on *in vivo* -seulontatesti ja sen soveltamista olisi tarkasteltava osana hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevaa OECD:n käsitekehystä (OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) (liite 2). Tässä käsitekehyksessä kohtuun aiheutuvia vaikutuksia mittaava biotesti sisältyy tasolle 3 *in vivo* -testinä, jolla tarjotaan tietoja yhdestä endokriinisesta mekanismista, estrogeenisesta toiminnasta.

4. Kohtuun aiheutuvia vaikutuksia koskevaan biotestiin on tarkoitus sisällyttää *in vitro*- ja *in vivo* -testiryhmä, joilla tunnistetaan sisäeritysjärjestelmään mahdollisesti vaikutuksia aiheuttavat kemikaalit. Viime kädessä tehdään ihmisten terveyttä tai ympäristöä koskevat riskinarvioinnit. OECD:n validointiohjelmassa käytetään vahvoja ja heikkoja estrogeenivaikutuksia omaavia agonisteja arvioimaan estrogeenisten kemikaalien tunnistamista koskevan testin tehokkuutta (4)(5)(6)(7)(8). Näin ollen testimenettelyn herkkyys estrogeenivaikutuksia omaaville agonisteille osoitettiin asianmukaisesti samoin kuin laboratorion sisäinen ja niiden välinen toistettavuus.

5. Negatiivisten kemikaalien osalta ainoastaan yksi 'negatiivinen' vertailukemikaali — joka jo todettiin negatiiviseksi kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa testissä sekä *in vitro* reseptorin sitoutumista koskevassa testissä ja reseptoritestissä — sisällytettiin validointiohjelmaan. Lisäksi on arvioitu muita testituloksia, jotka eivät liity OECD:n validointiohjelmaan, ja niillä tuetaan kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin spesifiyttä estrogeenivaikutuksia omaavien agonistien seulonnan suhteen (16).

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

6. Estrogeenivaikutuksia omaavat agonistit ja antagonistit toimivat ligandeina estrogeenireseptoreille a ja b, ja ne voivat aktivoida tai estää reseptoreiden ohjaaman geenitranskription. Tämä voi mahdollisesti aiheuttaa terveydelle vaaroja, kuten lisääntymis- ja kehitysvaikutuksia. Tästä syystä on arvioitava ja analysoitava nopeasti, voiko kemikaali toimia mahdollisesti estrogeenivaikutuksia omaavana agonistina tai antagonistina. Ligandin sitoutuminen estrogeenireseptoriin tai reportterigeenien transkription aktivointi *in vitro* tarjoaa tietoja, mutta kyseessä on ainoastaan yksi monista tekijöistä, jotka voivat osoittaa mahdollisen vaaran. Muihin voivat sisältyä metaboloinnin aktivointi ja deaktivointi kehoon siirtymisen yhteydessä, kohdekudoksiin jakautuminen ja poistuminen kehosta riippuen ainakin osittain altistusreitistä ja testattavasta kemikaalista. Tämän vuoksi on seulottava kemikaalin mahdollinen vaikutus *in vivo* tiettyjen olosuhteiden perusteella, ellei kemikaalin absorptiota, jakautumista, aineenvaihduntaa ja erittymistä koskevilla ominaisuuksilla jo tarjoa asianmukaista tietoa. Kohdun kudokset reagoivat estrogeenistimulaatioon nopealla ja voimakkaalla kasvulla erityisesti niiden laboratoriojyrsijöiden osalta, joiden kiimakierto kestää noin neljä päivää. Jyrsijälajeja, erityisesti rottia, käytetään myös laajasti myrkyllisyystutkimuksissa vaaratekijöiden kuvaamista varten. Tästä syystä jyrsijän kohtu on tarkoituksenmukainen kohde-elin estrogeenivaikutuksia omaavien agonistien ja antagonistien *in vivo* -seulontaa varten.

7. Tämä testimenetelmä perustuu sellaisiin OECD:n validointitutkimuksessa käytettyihin menettelyihin, joiden on osoitettu olevan luotettavia ja toistettavia laboratorioiden sisäisissä ja niiden välisissä tutkimuksissa (5)(7). Tällä hetkellä on käytössä kaksi menettelyä: täysikasvuista naarasta, jolta on poistettu munasarjat (ovarektomia), koskeva

menetelmä, jäljempänä 'ovx-täysikasvuista koskeva menetelmä', ja keskenkasvuista naarasta, jolta ei ole poistettu munasarjoja, koskeva menetelmä, jäljempänä 'keskenkasvuista eläintä koskeva menetelmä'. OECD:n testin validointiohjelmassa osoitettiin, että molemman menetelmän herkkyys ja toistettavuus vastasivat toisiaan. Kuitenkin keskenkasvuista eläintä, koska sillä on koskematon HPG-akseli (eli hypotalamusta, aivolisäkettä ja sukupuolirauhasia koskeva akseli), koskeva menetelmä on vähemmän spesifinen. Se kattaa kuitenkin laajemman tutkimusalan kuin ovx-eläintä koskevassa tapauksessa, koska se voi reagoida HPG-akseliin vaikuttavien kemikaalien, eikä vain estrogeenireseptorin kanssa. Rotan HPG-akseli on toimintakykyinen noin 15 päivän iässä. Sitä ennen puberteettia ei voida nopeuttaa GnRH:n (gonadoliberiini) kaltaisilla käsittelyillä. Kun naaras tulee puberteetti-ikäiseksi ennen emättimen avautumista, sillä on useita kuukautiskiertoja, jotka eivät johda emättimen avautumiseen tai ovulaatioon, mutta jonkinlaisia hormonaalisia vaihteluita esiintyy. Jos kemikaali stimuloi HPG-akselia suoraan tai epäsuorasti, tästä aiheutuu ennenaikainen puberteetti, varhainen ovulaatio ja nopeutunut emättimen avautuminen. Tätä eivät aiheuta pelkästään HPG-akselilla toimivat kemikaalit. Tietyt ruokavaliot, joilla on muita korkeampi muuntokelpoinen energiataso, edistävät kasvua ja nopeuttavat emättimen avautumista ilman, että niillä on estrogeenivaikutuksia. Tällaisilla kemikaaleilla ei aiheutettaisi uterotrofista reaktiota ovx-täysikasvuisissa eläimissä, sillä niiden HPG-akseli ei toimi.

8. Eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä etusija olisi annettava menetelmälle, jossa käytetään keskenkasvuisia rottia, jossa vältetään eläinten kirurgista esikäsittelyä ja jossa vältetään myös käyttämästä eläimiä, joissa havaitaan näyttöä kiimakiertoon siirtymisestä (ks. 30 kohta).

9. Uterotrofinen vaste ei aiheudu pelkästään estrogeeneistä, eli kemikaalit, jotka ovat muita kuin estrogeenivaikutuksia omaavia agonisteja tai antagonisteja, voivat myös aiheuttaa vasteen. Esimerkiksi suhteellisen suuret annokset progesteronia, testosteronia, tai useita synteettisiä progetiinejä voivat kaikki aiheuttaa vasteen (30). Kaikkia reaktioita voidaan myös analysoida histologisesti emättimen keratinisaation ja sarveistuman osalta (30). Vasteen mahdollisesta alkuperästä riippumatta kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin positiivisen tuloksen vuoksi olisi normaalisti suoritettava lisäselvityksiä. Estrogeenivaikutusta koskeva täydentävä näyttö voidaan saada *in vitro* -testeistä, kuten estrogeenireseptorin sitoutumistesteistä ja transkription aktivointia koskevista testeistä tai muista *in vivo* -testeistä, kuten naaraan puberteettia koskevasta testistä.

10. Kun otetaan huomioon, että kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevaa biotestiä voidaan käyttää *in vivo* -seulontatestinä, sovellettua validointimenetelmää voidaan hyödyntää eläinten hyvinvointiin liittyviä näkökohtia ja vaiheittaista testaamista koskevaa strategiaa varten. Tämän vuoksi pyrittiin validoimaan tarkasti estrogeenivaikutuksen osalta toistettavuus ja herkkyys — moniin kemikaaleihin liittyvä pääasiallinen huolenaihe –, mutta toimia toteutettiin vain vähän testin antiestrogeenivaikutusta koskevan komponentin osalta. Ainoastaan yhtä erittäin aktiivista antiestrogeenia testattiin, koska kemikaalien, joilla on selkeästi antiestrogeeninen profiili (joita ei häiritse vähäinen estrogeenin aktiivisuus), määrä on hyvin rajallinen. Näin ollen tämä testimenetelmä omistettiin estrogeenia koskevalle menettelylle, ja menettely, jossa kuvataan testin antagonista muotoa, sisällytettiin ohjeasiakirjaan (37). Pelkästään antiestrogeenisia kemikaaleja koskevan testin toistettavuus ja herkkyys määritellään selkeämmin myöhemmin sen jälkeen, kun tämä testimenettely on ollut rutiinikäytössä jonkin aikaa ja tällä toimintatavalla on tunnistettu enemmän kemikaaleja.

11. On pantava merkille, että kaikkien eläimiin perustuvien menettelyiden on täytettävä paikalliset eläinten hoitoa koskevat vaatimukset; jäljempänä esitetyt kuvaukset hoidosta ja käsittelystä ovat toimintaa koskevia vähimmäisvaatimuksia, ja ne korvataan paikallisilla säännöksillä, kuten tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 22 päivänä syyskuuta 2010 annetulla Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 2010/63/EU (38). OECD antaa lisäohjeita eläinten inhimillisestä kohtelusta (25).

12. Kuten kaikissa testeissä, joissa käytetään eläviä eläimiä, ennen testin aloittamista on tärkeää varmistaa, että tiedot ovat todella tarpeen. Esimerkkinä mainitaan kaksi edellytystä, jolloin tietoja voidaan tarvita:

— korkea altistuspotentiaali (käsitekehyksen taso 1, liite 2) tai osoitukset estrogeenivaikutuksesta (taso 2), jolloin tutkitaan, voivatko tällaiset vaikutukset esiintyä *in vivo*

— estrogeenivaikutuksia osoittavat vaikutukset tason 4 tai 5 *in vivo* -testeissä sen perustelemiseksi, että vaikutukset liittyivät estrogeenin mekanismiin, jota ei voida selvittää *in vitro* -testiä käyttämällä.

13. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät esitetään liitteessä 1.

TESTIN PERIAATE

14. Kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin herkkyys perustuu eläinkoejärjestelmään, jossa hypotalamusta, aivolisäkettä ja munasarjoja koskeva akseli ei toimi, mikä johtaa estrogeenin alhaiseen endogeeniseen tasoon. Tällä varmistetaan lähtötilanteen alhainen kohdun paino ja maksimimäärä annettavista estrogeeneista aiheutuvia vasteita. Jyrsijöillä tämän edellytyksen täyttävät kaksi estrogeenien kannalta herkkää vaihetta:

i) keskenkasvuiset naaraat vieroituksen jälkeen ja ennen puberteettia, ja

ii) nuoret täysikasvuiset naaraat, joille on suoritettu ovariektomia ja joiden kohdun kudoksille on annettu riittävästi aikaa toipua.

15. Testikemikaali annostellaan päivittäin suun kautta letkulla tai ihonalaisella injektiolla. Testikemikaalin porrastetut annokset annetaan vähintään kahdelle koeryhmälle (ks. ohjeistusta varten 33 kohta). Ryhmää kohden käytetään yksi annostaso. Keskenkasvuista eläintä koskevassa menetelmässä altistusaika on kolme peräkkäistä päivää ja ovx-täysikasvuista koskevassa menetelmässä lyhyin mahdollinen altistusaika on kolme peräkkäistä päivää. Koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus noin 24 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta. Estrogeenivaikutuksia omaavien agonistien osalta altistettujen eläinryhmien kohdun keskimääräistä painoa verrataan kantaja-ainetta saaneeseen ryhmään tilastollisesti merkittävän lisäyksen arvioimiseksi. Tilastollisesti merkittävä kohdun keskimääräinen painonlisäys testiryhmässä osoittaa positiivisen reaktion tähän biotestiin.

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin valinta

16. Testiin voidaan käyttää laboratoriossa yleisesti käytettyjä jyrsijäkantoja. Esimerkiksi validoinnissa käytettiin rottakantoja Sprague-Dawley ja Wistar. Niissä ei pitäisi käyttää kantoja, joiden kohdun tiedetään tai epäillään olevan vähemmän reaktiivinen. Laboratorion tulee osoittaa käytetyn kannan herkkyys siten, kuin tämä määritellään 26 ja 27 kohdassa.

17. Rottia ja hiiriä on käytetty tavallisesti kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa biotestissä 1930-luvulta lähtien. OECD:n validointitutkimukset suoritettiin ainoastaan rotilla, koska tulkittiin, että kummankin lajin odotetaan olevan vastaavia ja sen vuoksi yhden lajin pitäisi riittää kansainvälistä validointia varten. Näin säästetään resursseja ja eläimiä. Rotta on laji, joka on valittu useimpiin lisääntymistä ja kehitystä koskeviin toksisuustutkimuksiin. On otettava huomioon, että hiiristä on olemassa aikaisempia tietoja koskeva laaja tietokanta, ja jyrsijöiden kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin testimenetelmän alaa laajennettiin siten, että hiiriä käytettiin testilajina, ja hiiristä suoritettiin validointia varten rajoitettu seurantatutkimus (16). Tällainen vertailuun liittyvä lähestymistapa, jossa käytetään rajallinen määrä testikemikaaleja, johon osallistuu rajallinen määrä laboratorioita ja johon ei sisälly koodattuja testinäytteitä, valittiin, koska alkuperäinen tarkoitus oli resurssien ja eläimien säästäminen. Tämä vertailuun liittyvä validointitutkimus osoittaa nuorten täysikasvuisten hiiren, jolta on poistettu munasolut, kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin osalta, että rotista ja hiiristä saadut tiedot korreloivat laadullisesti ja määrällisesti keskenään. Mikäli kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskeva biotesti tehdään ennen pitkäaikaista tutkimusta, kummassakin kokeessa on käytettävä samaa eläinlajia ja -kantaa. Vertailuun perustuva lähestymistapa rajoittui ovx-täysikasvuisiin hiiriin, ja raportissa ei tarjota tarpeeksi kattavia tietoja keskenkasvuista eläintä koskevan mallin validoimiseksi, joten keskenkasvuisia hiiriä koskevan mallin ei katsota kuuluvan tämän testimenetelmän piiriin.

18. Näin ollen joissain tapauksissa rottien sijasta voidaan käyttää hiiriä. Tämän lajin käyttöä olisi perusteltava toksikologisilla, farmakokineettisillä ja/tai muilla kriteereillä. Hiirten osalta menettelyyn voidaan tarvita muutoksia. Esimerkiksi hiiret kuluttavat ruumiinpainon perusteella enemmän ravintoa kuin rotat, joten ravintoon sisältyvän fytoestrogeenin pitoisuuden olisi oltava hiirillä alhaisempi kuin rotilla (9)(20)(22).

Koe-eläinten häkit ja ruokinta

19. Kaikkien toimenpiteiden olisi oltava eläinten hoitoa koskevien paikallisten vaatimusten mukaisia. Nämä kuvaukset hoidosta ja käsittelystä ovat vähimmäisvaatimuksia, ja ne korvataan paikallisilla säännöksillä, kuten tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 22 päivänä syyskuuta 2010 annetulla Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 2010/63/EU (38). Koe-eläinhuoneen lämpötilan pitäisi olla 22 °C (se voi vaihdella noin ± 3 °C). Suhteellinen kosteus on vähintään 30 % eikä mielellään ylitä 70:tä % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana. Tavoitteena on 50–60 %:n suhteellinen kosteus. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta. Valaistusta olisi käytettävä jaksossa 12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää.

20. Laboratorioruokintaa ja juomaveden määrää ei saa rajoittaa. Nuoret täysikasvuiset eläimet voidaan pitää häkeissä yksittäin tai korkeintaan kolmen eläimen ryhmissä. Keskenkasvuisten eläinten nuoren iän vuoksi suositellaan muutaman eläimen pitämistä häkissä.

21. Laboratorioruokavalion fytoestrogeenin korkean tason tiedetään lisäävän jyrsijöiden kohdun painoa siinä määrin, että se vaikuttaa kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevaan biotestiin (13)(14)(15). Fytoestrogeenin ja muuntokelpoisen energian korkea taso laboratorioruokavaliossa voi myös johtaa varhaiseen puberteettiin, jos käytetään keskenkasvuisia eläimiä. Fytoestrogeenien esiintyminen johtuu pääasiassa soijan ja sinimailasen sisällyttämisestä laboratorioravintoon, ja fytoestrogeenien pitoisuuden on osoitettu vaihtelevan tavanomaisessa laboratorioravinnossa eläinryhmien välillä (23). Ruumiinpaino on tärkeä muuttuja, ja kulutetun ravinnon määrä on verrannollinen ruumiinpainoon. Tästä syystä samasta ruokavaliosta saatu todellinen fytoestrogeeniannos voi vaihdella lajien ja iän mukaan (9). Keskenkasvuisten naarasrottien ravinnonkulutus ruumiinpainoon nähden voi olla noin kaksi kertaa suurempi kuin nuorten täysikasvuisten naaraiden, joilta on poistettu munasarjat. Nuorten täysikasvuisten hiirten ravinnonkulutus ruumiinpainoon nähden voi olla noin neljä kertaa suurempi kuin nuorten täysikasvuisten naarasrottien, joilta on poistettu munasarjat.

22. Kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin tulokset (9)(17)(18)(19) osoittavat kuitenkin, että rajallinen määrä ravintoon sisältyvää fytoestrogeenia voidaan hyväksyä ja tämä ei vähennä biotestin herkkyyttä. Ohjeena on se, että ravintoon sisältyvän fytoestrogeenin taso ei saa ylittää Sprague Dawley- ja Wistar-lajien keskenkasvuisten naaraspuolisten rottien osalta 350:tä µg vastaavaa genisteiinin määrää/gramma (6)(9). Tällaisten ruokavalioiden olisi oltava myös tarkoituksenmukaisia, kun testataan nuoria täysikasvuisia rottia, joilta on poistettu munasarjat, koska nuorten täysikasvuisten eläinten ravinnonkulutus ruumiinpainoon nähden on alhaisempi keskenkasvuisiin verrattuna. Jos käytetään täysikasvuisia hiiriä, joilta on poistettu munasarjat, tai fytoestrogeenille herkempiä rottia, on harkittava, että ravintoon sisältyvän fytoestrogeenin tasoa vähennetään vastaavasti (20). Lisäksi erilaisista ruokavalioista johtuvat muuntokelpoiseen energiaan liittyvät erot voivat johtaa puberteetin alun siirtymiseen (21)(22).

23. Ennen tutkimusta edellytetään ruokavalion huolellista valintaa, ja sen fytoestrogeenien tai muuntokelpoisen energian taso ei saa olla korkea (ohjeistusta varten ks. (6)(9)), koska tämä vaikuttaisi tuloksiin häiritsevästi (15)(17)(19)(22)(36). Laboratorion käyttämän testijärjestelmän, siten kuin se määritellään 26 ja 27 kohdassa, moitteettoman suorittamisen varmistaminen on molemman tekijän osalta tärkeää. Hyvän laboratoriokäytännön perusteella on varmistettava, että kunkin tutkimuksen aikana annetun ravintoerän edustava näytteenotto suoritetaan fytoestrogeenisen sisällön mahdollista analyysiä varten (esim. siinä tapauksessa, että kohdun kontrollipaino on korkea suhteessa aiempiin kontrolleihin tai jos vaste referenssiestrogeeniin, 17-alfa-etinyyliestradioliin, ei ole riittävä). Osanäytteitä olisi analysoitava osana tutkimusta tai pakastettuna – 20 °C:een taikka siten, että näytteen hajoaminen ennen analyysiä estetään.

24. Joihinkin koehäkin alustan materiaaleihin voi sisältyä luonnossa esiintyviä estrogeenisia tai antiestrogeenisia kemikaaleja (esim. maissintähkän tiedetään vaikuttavan rottien sykliin ja sillä vaikuttaa olevan antiestrogeenivaikutuksia). Valittuun alusmateriaaliin pitäisi sisältyä mahdollisimman vähän fytoestrogeeneja.

Eläinten valmistelu

25. Koe-eläimet, joilla ei näy merkkejä taudista tai fyysisistä poikkeavuuksista, jaetaan satunnaisotannalla kontrolli- ja koeryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että niiden sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Jokainen eläinyksilö tunnistetaan. Keskenkasvuisia eläimiä olisi mieluiten pidettävä häkissä emojen tai sijaisemojen kanssa, ennen kuin ne vieroitetaan totutusvaiheen aikana. Tutkimusta edeltävän nuorten täysikasvuisten eläinten ja keskenkasvuisten eläinten, jotka toimitetaan emojen tai sijaisemojen kanssa, totutusvaiheen pituuden pitäisi olla noin viisi päivää. Jos keskenkasvuiset eläimet saadaan vastavieroitettuina ja ilman emoja, lyhyempi totutusvaihe voi olla tarpeen, koska annostelun pitäisi alkaa välittömästi vierotuksen jälkeen (ks. 29 kohta).

TESTIN SUORITTAMINEN

Laboratorioiden pätevyyden varmistaminen

26. Laboratorioiden pätevyyden varmistamiseen voidaan käyttää kahta eri vaihtoehtoa:

— Säännöllinen tarkastus, joka perustuu alkuperäiseen lähtötilanteen positiiviseen kontrollitutkimukseen (ks. 27 kohta). Vähintään kuuden kuukauden välein ja aina silloin, kun esiintyy muutos, joka voi vaikuttaa testin suoritukseen (esim. ruokavalion uusi koostumus, dissektiot suorittavaan henkilöstöön liittyvät muutokset, eläinkannan tai toimittajan muuttuminen), testijärjestelmän (eläinmalli) reaktio olisi varmistettava niin, että käytetään (edellä 27 kohdassa kuvatun lähtötilanteen positiivisen kontrollitutkimuksen perusteella) asianmukainen annos referenssiestrogeenia: 17-alfa-etinyyliestradiolia (CAS-nro 57-63-6) (EE).

— Käytetään rinnakkaisia kontrolleja ottamalla mukaan ryhmä, jolle annetaan asianmukainen annos referenssiestrogeenia kussakin testissä.

Jos järjestelmä ei reagoi odotetulla tavalla, koeolosuhteita olisi arvioitava ja muutettava arvion mukaisesti. On suositeltavaa, että kummassakin lähestymistavassa käytetyn referenssiestrogeenin annos on suunnilleen ED70–80.

27. **Lähtötilanteen positiivinen kontrollitutkimus** — ennen kuin laboratorio tekee tällaisen testimenetelmän mukaisen tutkimuksen ensimmäisen kerran, laboratorion pätevyys olisi osoitettava testaamalla eläinmallin reagointikykyä ja vahvistamalla referenssiestrogeenin annosvaste: 17-alfa-etinyyliestradioli (CAS-nro 57-63-6) (EE), vähintään neljällä annoksella. Kohdun painon reaktiota verrataan vakiintuneeseen aiempaan tietoon (ks. lähdettä (5)). Jos lähtötilanteen positiivinen kontrollitutkimus ei tuota odotettuja tuloksia, koeolosuhteita olisi tarkasteltava ja muutettava.

Eläinten lukumäärä ja kunto

28. Jokaiseen koe- ja kontrolliryhmään pitäisi sisältyä ainakin kuusi eläintä (sekä keskenkasvuisia että ovx-täysikasvuisia eläimiä koskevien menettelyiden osalta).

Keskenkasvuisten eläinten ikä

29. Keskenkasvuisiin eläimiin liittyvässä kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa biotestissä on esitettävä syntymäaika. Annostelu on aloitettava riittävän aikaisin, jotta varmistetaan, että testikemikaalin annostuksen loppuvaiheessa puberteettiin liittyvää endogeenisten estrogeenien fysiologista lisääntymistä ei ole vielä tapahtunut. Toisaalta on näyttöä siitä, että hyvin nuoret eläimet voivat olla vähemmän herkkiä. Kunkin laboratorion olisi otettava ihanteellisen iän määrittelyn osalta huomioon omat eläimen kasvuvaihetta koskevat taustatietonsa.

Yleinen ohje on, että annostelu rotille voidaan aloittaa välittömästi aikaisen vieroituksen jälkeen syntymän jälkeisenä päivänä 18 (syntymäaika on syntymän jälkeinen päivä 0). Annostelu rotille pitäisi mieluiten päättää syntymän jälkeisenä päivänä 21, mutta kaikissa tapauksissa ennen päivää 25, koska tämän jälkeen hypotalamusta, aivolisäkettä ja munasarjoja koskeva akseli on toiminnassa ja endogeenisen estrogeenin tasot voivat alkaa nousta. Samanaikaisesti nouseva lähtötason kohdun paino merkitsee, että ryhmän standardipoikkeamat lisääntyvät (2)(3)(10)(11)(12).

Munasarjojen poistamista koskeva menettely

30. Kun kyseessä ovat naarasrotat ja -hiiret, joilta poistetaan munasarjat (koe- ja kontrolliryhmät), ne olisi poistettava 6–8 viikon iässä. Rottien osalta munasarjojen poiston ja ensimmäisen annostelupäivän välillä olisi kuluttava vähintään 14 päivää, jotta kohtu voi palata vakaaseen minimitasoon. Hiirten osalta munasarjojen poiston ja ensimmäisen annostelupäivän välillä olisi kuluttava vähintään 7 päivää. Koska pieni määrä munasarjakudosta riittää tuottamaan merkittävän määrän estrogeenia (3), eläimet olisi testattava ennen käyttöä tarkkailemalla emättimestä tupolla otettuja epiteelisoluja ainakin viiden peräkkäisen päivän aikana (eli rottien munasarjojen poiston jälkeisinä päivinä 10–14). Jos eläimissä esiintyy jonkinlaista näyttöä kiimakierrosta, tällaisia eläimiä ei pitäisi käyttää. Lopuksi ruumiinavauksessa olisi tarkasteltava munasarjojen tynkiä näytön saamiseksi siitä, onko niissä munasarjakudosta. Jos on, eläintä ei pitäisi käyttää arvioinneissa (3).

31. Munasarjan poisto aloitetaan sen jälkeen, kun asianmukaisesti nukutettu eläin makaa vatsallaan. Viillon, jolla avataan selkä- ja kylkilihaksen puoleinen vatsanseinämä, pitäisi olla noin 1 cm:n pituinen pituussuunnassa kylkiluun alarajan ja suoliluun harjanteen välisessä keskipisteessä ja muutama millimetri sivussa lannelihaksen lateraalisesta reunasta. Munasarja olisi sen jälkeen poistettava vatsaontelosta aseptiselle alustalle. Munasarja olisi irrotettava munajohtimen ja kohdun runko-osan välisestä yhtymäkohdasta. Kun on varmistettu, että runsasta verenvuotoa ei esiinny, vatsanseinämä olisi suljettava ompeleella ja nahka olisi suljettava hakasella tai asianmukaisella ompeleella. Ligaatiokohdat esitetään kaavamaisesti kuvassa 1. Asianmukaista leikkauksen jälkeistä kivunlievitystä olisi käytettävä jyrsijöiden hoitoon erikoistuneen eläinlääkärin suosituksen mukaisesti.

Ruumiinpaino

32. Ovx-täysikasvuisia eläimiä koskevassa menettelyssä ruumiinpaino ja kohdun paino eivät korreloi, koska kohdun painoon vaikuttavat estrogeenin kaltaiset hormonit, mutta eivät ruumiin kokoa säätelevät kasvutekijät. Keskenkasvuisia eläimiä koskevan mallin osalta ruumiinpaino on kuitenkin yhteydessä kohdun painoon eläimen kasvukauden ajan (34). Tutkimuksen alkaessa keskenkasvuisten eläinten painonvaihtelun olisi oltava vähäistä, ja paino

saa vaihdella korkeintaan ± 20 % keskipainosta. Tämä merkitsee, että kasvattajan olisi yhdenmukaistettava poikueiden koko. Näin varmistetaan, että eri emojen poikaset ruokitaan suunnilleen samaan aikaan. Eläimet pitäisi jakaa ryhmiin (kontrolli- ja koeryhmiin) satunnaisen painojakauman mukaisesti, jotta minkään ryhmän keskimääräinen ruumiinpaino ei poikkea tilastollisesti muista ryhmistä. Samaan poikueeseen kuuluvia poikasia olisi vältettävä jakamasta samaan koeryhmään, kun tämä on käytännössä mahdollista, ilman että kokeeseen käytettävien poikueiden määrää lisätään.

Annostasot

33. Sen määrittämiseksi, voiko testattavalla kemikaalilla olla estrogeenistä vaikutusta *in vivo*, yleensä riittää kaksi annosryhmää ja yksi kontrolliryhmä. Tätä mallia pidetään siten parempana eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä. Jos tarkoituksena on annosvastekäyrän saaminen tai ekstrapolointi alempiin annoksiin, tarvitaan ainakin kolme annosryhmää. Jos tarvitaan estrogeeniaktiivisuuden tunnistamista laajempia tietoja (kuten arviota kemikaalin voimakkuudesta), olisi harkittava erilaista annostusta. Kontrolliryhmän eläimiä käsitellään aivan samoin kuin koeryhmän eläimiä, paitsi että niille ei anneta testikemikaalia. Jos kantaja-ainetta käytetään testikemikaalin annon yhteydessä, kontrolliryhmän pitäisi saada sama määrä koeryhmien käyttämää kantaja-ainetta (tai koeryhmien saama suurin määrä, jos ryhmien välillä esiintyy eroja).

34. Kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa biotestissä on tavoitteena valita annokset niin, että eläimen selviytyminen varmistetaan ja että niihin ei sisälly merkittävää toksisuutta tai ne eivät aiheuta eläimille kärsimystä kemikaalin antoa seuraavana kolmena peräkkäisenä päivänä, jolloin suurin annos on 1 000 mg/kg/päivä. Kaikki annostasot olisi ehdotettava ja valittava siten, että otetaan huomioon kaikki olemassa olevat toksisuus- ja kineettiset (toksikokineettiset) tiedot, jotka ovat saatavilla testikemikaalista tai siihen liittyvistä materiaaleista. Suurimman annostason osalta olisi ensin otettava huomioon LD50 (puolet tappava annos) ja/tai välitöntä myrkyllisyyttä koskevat tiedot, jotta eläinten kuolema, merkittävä kärsiminen tai tuska vältetään (24)(25)(26). Suurimman annoksen tulisi merkitä suurinta siedettävää annosta; annostasolla tehty tutkimus, joka aiheutti positiivisen uterotrofisen vasteen, on myös hyväksyttävä. Suojelutoimenpiteenä pitkät välit (esim. yksi 0,5 logaritmiyksikkö, joka vastaa annoslisäystä kertoimella 3,2, tai jopa yhden logaritmiyksikön verran) annosten välillä ovat yleensä hyväksyttäviä. Jos soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, voidaan tehdä annoksenmääritystutkimus, jonka perusteella käytettävät annokset voidaan määrittää.

35. Vaihtoehtoisesti, jos agonistin estrogeeninen vaikutus voidaan arvioida *in vitro* (tai *in silico*) -tiedoilla, ne voidaan ottaa annoksen valinnassa huomioon. Esimerkiksi testattavan kemikaalin määrä, joka aiheuttaa kohtuun vaikutuksia yhtä paljon kuin vertailukohteena oleva agonisti (etinyyliestradoli), arvioidaan sen etinyyliestradoliin kohdistuvien suhteellisten *in vitro* -vaikutusten perusteella. Korkein testiannos annettaisiin kertomalla tämä vertailukohteena oleva annos asianmukaisella kertoimella, kuten 10 tai 100.

Annoksenmääritystä koskevat näkökohdat

36. Tarvittaessa muutamalla eläimellä voidaan tehdä alustava annoksenmääritystutkimus. OECD:n ohjeasiakirjaa nro 19 (25) voidaan käyttää tältä osin määrittelemään sellaisten kliinisten oireiden esiintyminen, jotka viittaavat toksisuuteen tai eläimelle aiheutuvaan kärsimykseen. Tässä annoksenmääritystutkimuksessa voidaan, jos se on asianmukaista, leikata kohdut kolmen päivän jälkeen annoksen antamisesta ja punnita ne noin 24 tuntia viimeisen annoksen antamisen jälkeen. Näitä tietoja voidaan sen jälkeen käyttää varsinaisen tutkimuksen annostuksen suunnitteluun (voidaan valita suurin ja alin hyväksyttävä annos ja antaa suositus annosryhmien määrästä).

Antotapa

37. Testikemikaali annostellaan suun kautta letkulla tai ihonalaisella injektiolla. Antotavan valinnassa on otettava huomioon eläinten hyvinvointiin liittyvät näkökohdat sekä toksikologiset näkökohdat, kuten se, mikä merkitys on reitillä, jonka kautta ihminen altistuu kemikaalille (esim. suuletkua käytetään mallina aineen nautinnan suhteen, ihonalaista injektiota hengitysteiden tai ihoadsorption suhteen), testiaineen fyysiset/kemialliset ominaisuudet ja erityisesti olemassa olevat toksikologiset tiedot metaboloitumisesta ja kinetiikasta (esim. tarve välttää ensikierron metabolia, parempi tehokkuus tietyn reitin välityksellä).

38. Vesipitoisen liuoksen/suspension käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Koska useimmat estrogeenien ligandit tai niiden metaboliset prekursorit ovat yleensä hydrofobisia, yleisin menettelytapa on öljypohjaisen liuoksen/suspension käyttö (esimerkiksi maissi-, pähkinä-, seesami- tai oliiviöljy). Näillä öljyillä on kuitenkin erilainen kalori- ja rasvapitoisuus, joten kantaja-aine voi vaikuttaa koko muuntokelpoisen energian saantiin. Se voi siten muuttaa mitattavia ominaisuuksia, kuten kohdun painoa erityisesti, kun kyseessä on keskenkasvuisia eläimiä koskeva menetelmä (33). Näin ollen kaikkia käytettäviä kantaja-aineita olisi testattava ennen

tutkimusta kaikkiin kontrolleihin, joissa ei käytetä kantaja-aineita, nähden. Testikemikaalit voidaan liuottaa pieneen määrään 95-prosenttista etanolia tai muihin soveltuviin liuottimiin, ja niitä voidaan laimentaa lopulliseen pitoisuuteen kantaja-aineessa. Liuottimen myrkyllisyysominaisuudet on oltava tiedossa, ja niitä olisi testattava erillisen ainoastaan liuotinta saavan kontrolliryhmän avulla. Jos testikemikaalia pidetään stabiilina, sen liuottamisen edistämiseksi voidaan käyttää varovaista lämmitystä ja voimakkaita mekaanisia toimenpiteitä. Testattavan kemikaalin stabiliteetti kantaja-aineessa tulee määrittää. Jos testikemikaali on stabiili koko tutkimuksen ajan, voidaan valmistaa yksi alkuerä testikemikaalia. Määritelty annos laimennoksia valmistetaan päivittäin.

39. Annostuksen ajoitus riippuu käytettävästä mallista (ks. keskenkasvuisia eläimiä koskevan mallin osalta 29 kohta ja ovx-täysikasvuisia eläimiä koskevan mallin osalta 30 kohta). Keskenkasvuisille naarasrotille annetaan testikemikaalia päivittäin kolmena peräkkäisenä päivänä. Naaraspuolisille rotille, joiden munasarja on poistettu, suositellaan myös kolmen päivän käsittelyä, mutta pidempi altistus on hyväksyttävä, ja sillä voidaan parantaa heikkotehoisten kemikaalien havaitsemista. Kun kyseessä ovat naaraspuoliset hiiret, joilta on poistettu munasarjat, 3 päivän käsittely on riittävä, ja merkittävää etua ei saada siitä, että koetta jatketaan seitsemän päivän ajan vahvojen estrogeenivaikutusia omaavien agonistien osalta. Tätä suhdetta ei ole kuitenkaan osoitettu validointitutkimuksessa heikkojen estrogeenien osalta (16), joten annostelua jatketaan korkeintaan 7 peräkkäiseen päivään ovx-täysikasvuisten hiirten osalta. Annokset annetaan samaan aikaan joka päivä. Niitä olisi mukautettava tarpeen vaatiessa, jotta eläimelle annetaan ruumiinpainoon jatkuvasti suhteutettu annos (esim. milligramma testikemikaalia painokiloa kohti vuorokaudessa). Testiaineen nestemäärän tilavuuden osalta sen vaihtelua ruumiinpainon perusteella olisi minimoitava mukauttamalla annosteluliuoksen pitoisuutta. Tarkoituksena on taata kaikilla annostasoilla ja kaikkien annostelureittien osalta jatkuva määrä ruumiinpainon perusteella.

40. Kun testikemikaalia annetaan letkuruokinnassa, aine on annettava eläimille yhtenä annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Suurin kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Olisi noudatettava paikallisia eläinten hoitoa koskevia vaatimuksia, mutta nestemäärän tilavuus ei saa ylittää 5 ml/painokilo. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 10 ml/painokilo.

41. Kun testikemikaali annostellaan ihonalaisella injektiolla, se olisi annettava yhtenä päivittäisenä annoksena. Annokset olisi annettava lapaluun taakse tai lantion alueelle steriilillä neulalla (esim. 23 tai 25 gaugen neula) ja tuberkuliiniruiskulla. Pistokohdan ajeleminen on vapaaehtoista. Kaikki annosvajaukset ja vuodot pistoskohdassa tai puutteellinen annostus olisi kirjattava. Nestemäärän kokonaistilavuus, joka injektoidaan rottaan päivittäin, ei saa ylittää 5:tä ml/painokilo, ja määrä on jaettava kahteen pistoskohtaan. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 10 ml/painokilo.

Tarkkailu

Yleiset ja kliiniset havainnot

42. Yleiset kliiniset havainnot olisi tehtävä vähintään kerran päivässä ja useammin, jos havaitaan oireita toksisuudesta. Havaintoja olisi tehtävä mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkia eläimiä tarkkaillaan niin, että huomiota kiinnitetään kuolleisuuteen, sairastuvuuteen ja yleisiin kliinisiin oireisiin, kuten muutoksiin käyttäytymisessä, ihon, turkin, silmien, limakalvojen eritteiden erityksen sekä autonomisen hermoston toimintaan (esim. kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, poikkeava hengitys).

Eläimen paino ja ravinnon kulutus

43. Kaikki eläimet olisi punnittava lähimpään 0,1 grammaan. Punnitus aloitetaan juuri ennen kokeen aloittamista, eli kun eläimet jaetaan ryhmiin. Valinnaisena mittana voidaan käyttää altistusjakson aikana kulutetun ravinnon määrää, joka voidaan mitata häkkiä kohti punnitsemalla annostelulaitteet. Ravinnon kulutuksesta saadut tulokset olisi ilmoitettava grammoina rottaa kohti päivässä.

Dissektio ja kohdun painon mittaaminen

44. Kaksikymmentäneljä tuntia viimeisen käsittelyn jälkeen rotat lopetetaan inhimillisesti. Ihannetapauksessa ruumiinavausjärjestys satunnaistetaan ryhmien välillä, jotta vältetään etenemistä suoraan ylös tai alaspäin annosryhmiä, mikä voi vaikuttaa jonkin verran tietoihin. Biotestin tavoitteena on mitata kohdun märkä- ja kuivattu paino. Märkäpainoon sisältyy kohtu ja luminaalinesteen sisältö. Kuivattu paino mitataan sen jälkeen, kun kohdun luminaalineste on puristettu ulos ja poistettu.

45. Ennen dissektiota keskenkasvuisten eläinten emättimen avautuminen tutkitaan. Dissektiomenettely aloitetaan avaamalla vatsanseinämä häpyliitoksesta alkaen. Sen jälkeen kohdunsarvi ja munasarjat, jos niitä on, poistetaan selänpuoleisesta vatsanseinämästä. Virtsarakko ja virtsajohtimet poistetaan kohdusta ja emättimestä vatsan puolelta ja lateraaliselta puolelta. Peräsuolen ja emättimen välissä oleva sidekudoksesta muodostuva liitos irrotetaan, kunnes emättimen aukkoa ja välilihan nahkaa voidaan havainnoida. Kohtu ja emätin irrotetaan ruumiista leikkaamalla emättimen seinämää aivan välilihan välisen yhdyskohdan nahan yläpuolelta, kuten esitetään kuvassa 2. Kohtu irrotetaan rungon seinämästä leikkaamalla varovaisesti kohdun mesenteria kohdassa, jossa se kiinnittyy kunkin kohdunsarven dorsolateraalisen sivun koko pituudelta. Sen jälkeen kun kohtu poistetaan ruumiista, sen käsittelyn olisi oltava tarpeeksi nopeaa, jotta kudoksien kuivuminen vältetään. Kuivumisesta aiheutuva painonlasku on suurempi pienten kudoksien, kuten kohdun tapauksessa (23). Jos munasarjoja ei ole poistettu, ne poistetaan munajohtimesta välttäen, että luminaalineste ei valu pois kohdunsarvesta. Jos eläimeltä on poistettu munasarjat, olisi tutkittava, onko tyngissä munasarjakudosta. Ylimääräinen rasva ja sidekudos olisi puhdistettava pois. Emätin irrotetaan kohdusta aivan kohdunkaulan alapuolelta niin, että kohdunkaula pysyy kohdun runko-osassa, kuten esitetään kuvassa 2.

46. Kukin kohtu olisi siirrettävä yksilöllisesti merkittyyn ja punnittuun astiaan (esim. petriastia tai muovikulho). Kuivumista olisi pyrittävä jatkuvasti välttämään ennen punnitsemista (esim. sijoittamalla astiaan suodatinpaperi, jota on kostutettu hieman suolaliuoksella). Kohtu, joka sisältää luminaalinesteen, punnitaan lähimpään 0,1 milligrammaan (kohdun märkäpaino).

47. Jokainen kohtu käsitellään sen jälkeen erikseen luminaalinesteen poistamiseksi. Kummatkin kohdunsarvet lävistetään tai leikataan pituussuuntaan. Kohtu asetetaan hieman kostutetulle suodatinpaperille (esim. Whatman nro 3), ja sitä painetaan varovasti toisella kostutetulla suodatinpaperilla, jotta luminaalineste poistuu kokonaan. Kohtu, josta luminaalineste on poistettu, punnitaan lähimpään 0,1 milligrammaan (kohdun kuivapaino).

48. Tutkimuksen päättämisen yhteydessä kohdun painoa voidaan käyttää varmistamaan, että keskenkasvuisen leikkaamattoman rotan asianmukainen ikä ei ylittynyt, mutta laboratorion käyttämät rottakantaa koskevat aikaisemmat tiedot ovat tässä asiassa ratkaisevia (ks. tulosten tulkinnan osalta 56 kohta).

Vapaaehtoiset tutkimukset

49. Punnitsemisen jälkeen kohtu voidaan fiksoida 10-prosenttiseen neutraalipuskuroituun formaliiniin, jotta sitä voidaan tutkia histopatologisesti hematosykliini- ja eosiinivärjäyksen jälkeen. Emätintä voidaan tutkia vastaavasti (ks. 9 kohta). Lisäksi kohdun limakalvon pinnasta voidaan tehdä morfometrinen mittaus kvantitatiivista vertailua varten.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tiedot

50. Tutkimustietoihin olisi sisällyttävä:

— eläinten lukumäärä testin alussa

— testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten määrä ja tunnistetiedot sekä kuoleman tai lopettamisen päivä ja aika

— niiden eläinten lukumäärä ja tunnistetiedot, joissa myrkyllisyysvaikutuksia on havaittavissa, ja kuvaus havaituista myrkyllisyysvaikutuksista mukaan lukien myrkytysoireiden alkamisaika, kesto ja vaikeusaste

— niiden eläinten lukumäärä ja tunnistetiedot, joissa on havaittavissa vammoja ja vammojen tyyppi.

51. Yksittäisiä eläimiä koskevat ruumiinpainoon, kohdun märkäpainoon ja kuivattuun painoon liittyvät tiedot olisi kirjattava. Agonisteja koskevaa yksitahoista tilastoanalyysia olisi käytettävä sen määrittämiseksi, johtiko testikemikaalin antaminen tilastollisesti merkittävään kohdun painon nousuun (p-arvo < 0,05). Olisi suoritettava asianmukaiset tilastoanalyysit, joilla testataan käsittelyyn liittyviä muutoksia kohdun märkäpainon ja kuivatun kohdun painon osalta. Esimerkiksi tietoja voidaan arvioida kovarianssianalyysiä koskevalla lähestymistavalla, jossa ruumiinpaino on ruumiinavauksessa kovariantti. Varianssin stabiloimisiin käytettävä logaritminen muunnos voidaan toteuttaa kohtua koskeviin tietoihin ennen tietojen analysointia. Dunnetin ja Hsun testi soveltuu kunkin annosryhmän vertailevaan arviointiin kantaja-ainekontrolliin nähden ja luottamusvälien laskemiseksi.

Standardoitua residuaalia voidaan käyttää kuvauksena mahdollisten poikkeamien havaitsemiseksi ja varianssien homogeenisuuden arvioimiseksi. Näitä menettelyjä sovellettiin OECD:n validointiohjelmassa käyttämällä tilastoanalyysijärjestelmässä tilasto-ohjelman PROC CLM (SAS Institute, Cary, Pohjois-Carolina, Yhdysvallat) versiota 8 (6) (7).

52. Loppuraporttiin sisältyy:

Testauslaitos:

— vastuuhenkilöstö ja heidän tutkimusta koskevat vastuualueensa

— lähtötilanteen positiivinen kontrollitesti ja määräajoin saatavat positiiviset kontrollitiedot (ks. 26 ja 27 kohta).

Testikemikaali:

— testikemikaalien kuvaus

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet

— laimennoksien valmistelun menetelmä ja valmistustiheys

— stabiliteetista tuotetut kaikki tiedot

— annosteluliuoksiin liittyvät kaikki analyysit.

Kantaja-aine:

— kantaja-aineen kuvaus (laatu, toimittaja ja erä)

— perustelu kantaja-aineen valinnalle (jos se on muu kuin vesi).

Koe-eläinlajit:

— käytetty eläinlaji ja kanta ja perustelu niiden valinnalle

— toimittaja ja toimittajan tilat

— toimitusikä ja syntymäaika

— jos eläimet ovat keskenkasvuisia, tiedot siitä, toimitettiinko ne emon tai sijaisemon kanssa, ja vieroitusajankohta

— tiedot eläimen totutukseen käytetystä menettelystä

— eläinten lukumäärä häkkiä kohti

— kunkin eläimen ja ryhmän tunnistamista koskevat yksityiskohdat ja menettely.

Testiolosuhteet:

— satunnaisotosta (eli sovellettua menettelyä) koskevat yksityiskohdat

— annoksen valintaperusteet

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin koostumuksesta, sen saavutetusta pitoisuudesta, stabiiliudesta ja tasalaatuisuudesta

— tiedot testikemikaalin annostuksesta ja altistusreitin valintaa koskevat valintaperusteet

— ravinto (nimi, tyyppi, toimittaja, sisältö ja, jos tiedossa, fytoestrogeenin tasot)

— vesilähde (esim. vesijohtovesi tai suodatettu vesi) ja jakelu (esim. putkistolla suuresta säiliöstä tai pulloista)

— alustan materiaali (nimi, tyyppi, toimittaja, sisällys)

— tiedot häkkiolosuhteista, valaistusjaksoista, huoneen lämpötilasta ja kosteudesta sekä huoneen siivouksesta

— yksityiskohtainen kuvaus ruumiinavausta ja kohdun punnitsemista koskevista menetelmistä

— kuvaus tilastollisista menettelytavoista

Tulokset

Yksittäisten eläinten osalta:

— kunkin eläimen päivittäinen ruumiinpaino (ryhmiin jakamisesta ruumiinavaukseen saakka) (lähimpään 0,1 grammaan)

— kunkin eläimen ikä (päivissä pitäen syntymäajankohtaa päivänä 0) testikemikaalin antamisen alkamisesta lähtien

— kunkin annoksen antamispäivä ja -aika

— laskettu annettu määrä ja annostus sekä havainnot annosvajauksista annosten antamisen yhteydessä tai sen jälkeen

— päivittäiset merkinnät eläimen tilasta mukaan lukien asiaankuuluvat oireet ja havainnot

— epäilty kuolinsyy (jos eläin havaitaan tutkimuksen aikana kuolemaisillaan olevaksi tai kuolleeksi)

— inhimillisen lopettamisen päivämäärä ja aika sekä aikaväli viimeisen annoksen antamiseen

— kohdun märkäpaino (lähimpään 0,1 milligrammaan) ja kaikki havainnot luminaalinesteen vuotamisesta dissektion ja punnituksen valmistelun aikana

— kuivatun kohdun paino (lähimpään 0,1 milligrammaan).

Kunkin eläinryhmän osalta:

— kunkin eläimen päivittäinen ruumiinpaino (lähimpään 0,1 grammaan) ja standardipoikkeama (ryhmiin jakamisesta ruumiinavaukseen saakka)

— keskimääräinen kohdun märkäpaino ja keskimääräinen kohdun kuivapaino (lähimpään 0,1 milligrammaan) ja standardipoikkeamat

— päivittäinen ravinnonkulutus, mikäli se mitataan (lasketaan grammoina kulutettua ravintoa eläintä kohti)

— tulokset tilastoanalyyseistä, joissa verrataan kohderyhmien kohdun märkäpainoja ja kuivatun kohdun painoja kantaja-ainetta saaneen kontrolliryhmän vastaaviin mittaustuloksiin

— tulokset tilastoanalyysistä, jossa verrataan kohderyhmien ruumiin kokonaispainoa ja painonnousua kantaja-ainetta saaneen kontrolliryhmän vastaaviin mittaustuloksiin

53. Tiivistelmä testimenetelmän tärkeistä ohjeista

	Rotta	**Hiiri**
Eläimet		
Kanta	Laboratorioissa yleisesti käytetyn jyrsijän kanta	
Eläinten lukumäärä	Vähintään kuusi eläintä annosryhmää kohti	
Ryhmien lukumäärä	Vähintään kaksi testiryhmää (ks. ohjeita varten 33 kohta) ja negatiivinen kontrolliryhmä Katso positiivisia kontrolliryhmiä koskevia ohjeita varten 26 ja 27 kohta	
Koe-eläinen häkit ja ruokinta		
Eläinhuoneen lämpötila	22 °C ± 3 °C	
Suhteellinen kosteus	50–60 % ja ei alle 30 % tai yli 70 %	
Päivittäiset valaistusjaksot	12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää	
Ravinto ja juomavesi	Rajoittamattomasti	

	Rotta	Hiiri
Häkki	Yksittäin tai korkeintaan kolmen eläimen ryhmissä (keskenkasvuisille eläimille suositellaan muutaman eläimen pitämistä häkissä)	
Ravinto ja alusmateriaali	Ravinnon ja alusmateriaalin sisältämä fytoestrogeenin määrä olisi oltava vähäinen	
Tutkimusmenettely		
Menettely	Keskenkasvuista eläintä, jolta ei ole poistettu munasarjoja, koskeva menettely (suositeltava) Täysikasvuista naaraspuolista eläintä, jolta on poistettu munasarjat, koskeva menettely	Täysikasvuista naaraspuolista eläintä, jolta on poistettu munasarjat, koskeva menettely
Keskenkasvuisten eläinten annoksen antoikä	Aikaisintaan syntymän jälkeinen päivä 18. Annostus pitäisi päättää ennen syntymän jälkeistä päivää 25	Ei merkitystä tämän testimenetelmän soveltamisalalle
Ikä, jolloin tehdään ovariektomia	6–8 viikon iässä	
Eläinten, joilta on poistettu munasarjat, annoksen antoikä	Munasarjojen poiston ja ensimmäisen annostelupäivän välillä olisi kuluttava vähintään 14 päivää.	Munasarjojen poiston ja ensimmäisen annostelupäivän välillä olisi kuluttava vähintään 7 päivää.
Ruumiinpaino	Ruumiinpainon vaihtelun olisi oltava mahdollisimman vähäinen, enintään ± 20 % keskipainosta	
Annostelu		
Annostelureitti	Suun kautta letkulla tai ihon alle annettavalla injektiolla	
Annostelutiheys	Yksi vuorokausiannos	
Letkun ja injektion kautta annettavan määrän tilavuus	≤ 5ml/painokilo (tai korkeintaan 10 ml/painokilo, jos käytetään vesiliuosta) (ihonalaista reittiä kahteen pistoskohtaan)	
Annostelun kesto	3 peräkkäistä päivää keskenkasvuisia eläimiä koskevan mallin osalta Vähintään 3 peräkkäistä päivää täysikasvuisia eläimiä, joilta on poistettu munasarjat, koskevan mallin osalta	Seitsemän peräkkäistä päivää täysikasvuisia eläimiä, joilta on poistettu munasarjat, koskevan mallin osalta
Ruumiinavauksen ajankohta	Noin 24 tuntia viimeisen annoksen jälkeen	
Tulokset		
Positiivinen reaktio	Tilastollisesti merkittävä kohdun keskipainon (märkä- ja/tai kuivapaino) lisääntyminen	
Referenssiestrogeeni	17-alfa-etinyyliestradioli	

TULOKSIEN TULKINTAA JA HYVÄKSYMISTÄ KOSKEVAT OHJEET

54. Estrogeenivaikutuksia koskevaa testiä olisi pidettävä positiivisena, jos kohdun paino lisääntyy tilastollisesti merkittävällä tavalla (p-arvo < 0,05) ainakin suurimman annostason osalta liuotinta saavaan kontrolliryhmään verrattuna. Positiivista tulosta tukee myös annoksen ja vasteen suuruusluokan välisen biologisesti vakuuttavan suhteen osoittaminen. On pidettävä mielessä, että testikemikaalin päällekkäinen estrogeeni- ja antiestrogeenivaikutus voi vaikuttaa annosvastekäyrän muotoon.

55. Tietojen asianmukaisen arvioinnin varmistamiseksi on pidettävä huolta, että suurinta siedettävää annosta ei ylitetä. Tältä osin olisi perusteellisesti arvioitava ruumiinpainon laskua, kliinisiä oireita ja muita havaintoja.

56. Kantaja-ainetta saavan kontrolliryhmän kohdun painoja pidetään kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin tietojen hyväksynnän kannalta tärkeänä näkökohtana. Korkeat kontrolliarvot voivat vaarantaa biotestistä saatavan vasteen ja kyvyn havaita erittäin heikot estrogeenivaikutuksia omaavat agonistit. Ammattikirjallisuudessa ja tiedoissa, joita saatiin kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin validoinnin aikana, todetaan, että kontrolleissa esiintyy spontaanisti korkeita keskiarvoja erityisesti kasvuvaiheessa olevilla eläimillä (2)(3)(6)(9). Koska keskenkasvuisten rottien kohdun paino on riippuvainen monista muuttujista, kuten kannasta tai ruumiinpainosta, kohdun painolle ei voida antaa mitään lopullista ylärajaa. Ohjeena on, että jos keskenkasvuisten kontrollirottien kuivatun kohdun paino on 40 ja 45 milligramman välillä, tuloksia on pidettävä kyseenalaisina. Jos kohtu painaa yli 45 milligrammaa, testin suorittaminen uudelleen voi olla tarpeen. Tätä on kuitenkin harkittava tapauskohtaisesti (3)(6)(8). Kun testi tehdään täysikasvuisilla rotilla, epätäydellisesti suoritetusta ovariektomiasta jää munasarjakudosta, joka voi tuottaa endogeenistä estrogeeniä ja hidastaa kohdun painon regressiota.

57. Kantaja-ainetta saavan kontrolli-ryhmän kuivattujen kohtujen painot, jotka ovat alle 0,09 % keskenkasvuisten naarasrottien ruumiinpainosta ja alle 0,04 % nuorten täysikasvuisten naaraiden ruumiinpainosta, vaikuttavat tuottavan hyväksyttäviä tuloksia (ks. taulukko 31 (2)). Jos kontrolliryhmän kohtujen paino on näitä suurempi, olisi tarkasteltava eri tekijöitä, kuten eläinten ikää, asianmukaisesti suoritettua munasarjojen poistoa, ravinnon fytoestrogeeneja, ja negatiivista testitulosta (jossa ei havaita estrogeenivaikutusta) olisi käytettävä harkitsevasti.

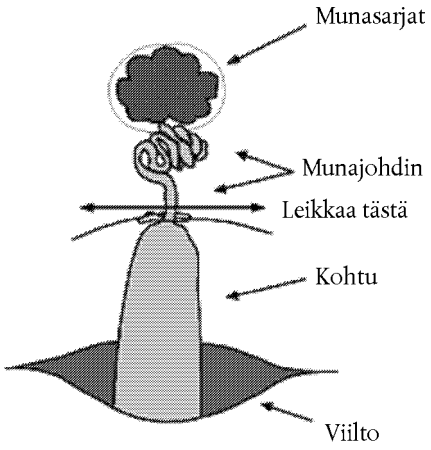
58. Kantaja-ainetta saaneen kontrolliryhmän aikaisemmat tiedot olisi säilytettävä laboratoriossa. Positiivisten referenssiestrogeenien, kuten 17-alfa-etinyyliestradolin, vasteita koskevat aikaisemmat tiedot olisi myös säilytettävä laboratoriossa. Laboratoriot voivat myös testata vastetta tunnettuihin heikon estrogeenivaikutuksen omaaviin agonisteihin. Kaikkia näitä tietoja voidaan verrata saatavilla oleviin tietoihin (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8). Näin varmistetaan laboratorion menetelmien riittävä herkkyys.

59. Kuivatun kohdun painot vaihtelivat OECD:n validointitutkimuksessa vähemmän kuin kohdun märkäpainot (6)(7). Merkittävä vaste kummassakin toimessa osoittaa kuitenkin, että testikemikaali on estrogeenivaikutuksen osalta positiivinen.

60. Kohtuun vaste ei aiheudu pelkästään estrogeeneista. Kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevan biotestin positiivista tulosta olisi kuitenkin yleensä tulkittava todisteena mahdollisista estrogeenivaikutuksista *in vivo*, ja sen vuoksi olisi tavallisesti käynnistettävä täydentäviä selvitystoimia (ks. hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevat OECD:n käsitteelliset puitteet (OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals), liite 2).

Kuva 1

Kaavio, jossa esitetään munasarjojen kirurginen poisto



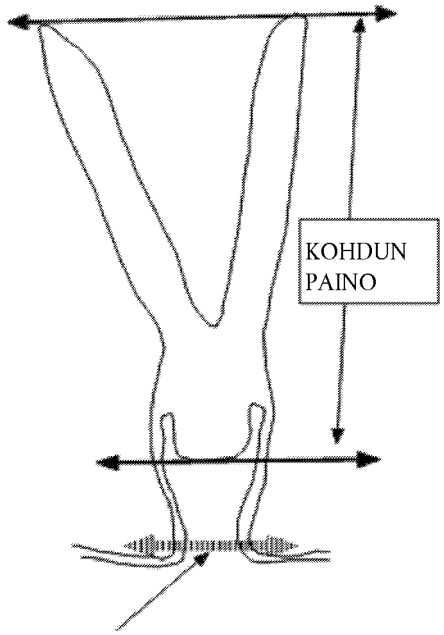
Suolilievettä, verisuonistoa ja rasvakudosta ei ole esitetty

Toimenpide aloitetaan avaamalla selkä- ja kylkilihaksen puoleinen vatsanseinämä pituussuunnassa kylkiluun alarajan ja suoliluun harjanteen välisestä keskipisteestä ja muutama millimetri sivuun lannelihaksen lateraalisesta reunasta. Munasarjat olisi paikannettava vatsaontelon sisällä. Munasarjat olisi sen jälkeen poistettava vatsaontelosta

aseptiselle alustalle, munasarjan ja kohdun välille olisi sijoitettava sidos verenvuodon hillitsemiseksi, ja munasarja poistetaan sidoksen päälle tehtävällä leikkauksella munajohtimen ja kunkin kohdunsarven yhtymäkohdasta. Kun on varmistettu, että runsasta verenvuotoa ei esiinny, vatsanseinämä olisi suljettava ompeleella ja nahka olisi suljettava hakasella tai ompeleella. Eläinten olisi annettava toipua ja kohdun painon palautua vähintään 14 päivän ajan ennen käyttöä.

Kuva 2

Kohdun kudosten irrottaminen ja valmisteleminen painonmittausta varten



Tämä menettely aloitetaan avaamalla vatsanseinämä häpyliitoksesta alkaen. Sen jälkeen kohdunsarvi ja munasarjat, jos niitä on, poistetaan selänpuoleisesta vatsanseinämästä. Virtsarakko ja virtsajohtimet poistetaan kohdusta ja emättimestä vatsan puolelta ja sivupuolelta. Peräsuolen ja emättimen välissä oleva sidekudoksesta muodostuva liitos irrotetaan, kunnes emättimen aukkoa ja välilihan nahkaa voidaan havainnoida. Kohtu ja emätin irrotetaan ruumiista leikkaamalla emättimen seinämää aivan välilihan välisen yhdyskohdan nahan yläpuolelta, kuten kuvassa esitetään. Kohtu irrotetaan rungon seinämästä leikkaamalla varovaisesti kohdun mesenteria kohdassa, jossa se kiinnittyy kunkin kohdunsarven dorsolateraalisen sivun koko pituudelta. Sen jälkeen kun se irrotetaan ruumiista, ylimääräinen rasva ja sidekudos puhdistetaan pois. Jos munasarjoja ei ole poistettu, ne poistetaan munajohtimesta välttäen, että luminaalineste ei valu pois kohdunsarvesta. Jos eläimeltä on poistettu munasarjat, olisi tutkittava, onko tyngissä munasarjakudosta. Emätin irrotetaan kohdusta aivan kohdunkaulan alapuolelta niin, että kohdunkaula pysyy kohdun runko-osassa, kuten kuvassa esitetään. Kohtu voidaan sen jälkeen punnita.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT:

Antiestrogeenivaikutus on kemikaalin kyky estää 17-beeta-estradiolin vaikutus nisäkkään elimistössä.

Kemikaalilla tarkoitetaan ainetta tai aineiden seosta.

Syntymäaika on syntymän jälkeinen päivä 0.

Annostus on yleinen käsite, johon sisältyy annos, annostiheys ja annostuksen kesto.

Annos on annostellun testikemikaalin määrä. Kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa biotestissä annos ilmaistaan testikemikaalin painona koe-eläimen ruumiinpainon yksikköä kohden vuorokaudessa (esim. milligramma testikemikaalia painokiloa kohti vuorokaudessa).

Suurin siedettävä annos on korkein määrä kemikaalia, joka ei tapa koe-eläimiä siirtyessään niiden ruumiiseen (LD_0) (IUPAC, 1993).

Estrogeenivaikutus on kemikaalin kyky toimia 17-beeta-estradiolin tavoin nisäkkään elimistössä.

Syntymän jälkeinen päivä X on eläimen syntymästä lähtien laskettava elinpäivä X.

Herkkyys on testissä oikein luokiteltujen kaikkien positiivisten/aktiivisten kemikaalien osuus. Se on täsmällisyyden mitta testimenetelmässä, jolla tuotetaan kategorisia tuloksia, ja se on tärkeä ottaa huomioon testimenetelmän asianmukaisuuden arvioinnissa.

Spesifiys on testissä oikein luokiteltujen kaikkien negatiivisten/ei-aktiivisten kemikaalien osuus. Se on täsmällisyyden mitta testimenetelmässä, jolla tuotetaan kategorisia tuloksia, ja se on tärkeä ottaa huomioon testimenetelmän asianmukaisuuden arvioinnissa.

Testikemikaali on mitä tahansa aine tai seos, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää.

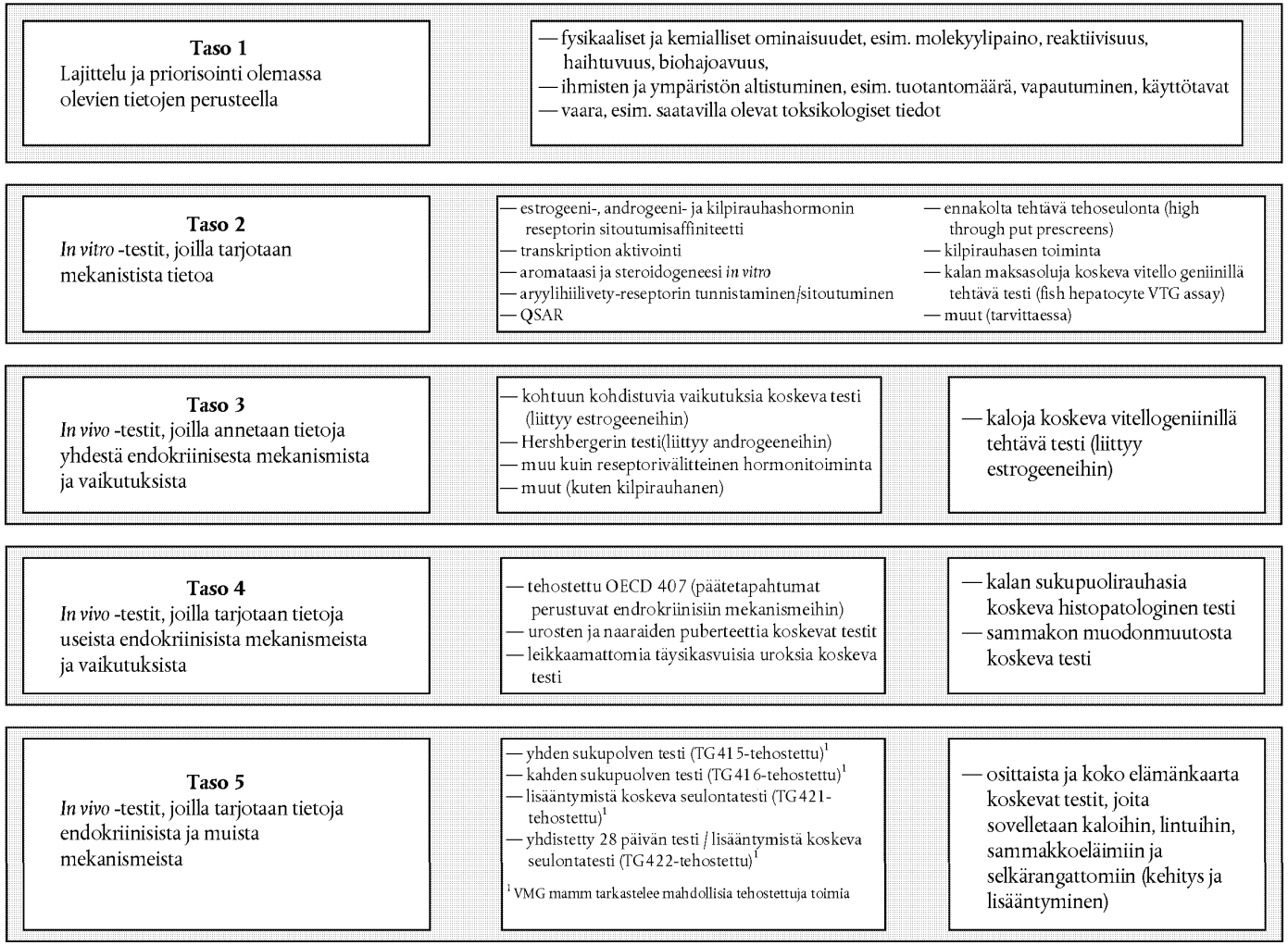
Kohtuun kohdistuva vaikutus on käsite, jolla kuvataan positiivista vaikutusta kohdun kudosten kasvuun.

Validointi on tieteellinen prosessi, joka on suunniteltu kuvaamaan toiminnallisia vaatimuksia ja testimenetelmän rajoja sekä osoittamaan sen luotettavuus ja asiaankuuluvuus tiettyä tarkoitusta varten.

Lisäys 2

Huom.: Testiohjeita koskevan ohjelman sihteeristön valmistelema asiakirja hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevan työryhmän (EDTA) 6. kokouksessa tehdyn sopimuksen pohjalta

OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevat käsitteelliset puitteet



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

KÄSITEKEHYKSEEN LIITTYVÄT HUOMAUTUKSET:

Huomautus 1: Siirtyminen ja poistuminen on mahdollista kaikilla tasoilla ja riippuu olemassa olevan tietotarpeen luonteesta vaaran ja riskin arvioinnin suhteen.

Huomautus 2: Tasolla 5 ekotoksilogiaan olisi sisällyttävä päätetapahtumat, jotka osoittavat haittavaikutuksia koskevat mekanismit ja populaatiolle mahdollisesti aiheutuvat vahingot.

Huomautus 3: Jos multimodaalimallilla katetaan useita yksittäisiä päätetapahtumia koskevia testejä, tämä malli korvaa tällaiset yksittäisiä päätetapahtumia koskevat testit.

Huomautus 4: Kunkin kemikaalin arvioinnin olisi oltava tapauskohtainen, ja siinä otetaan huomioon kaikki saatavilla oleva tieto kehyksen tasojen tarkoituksen huomioon ottaen.

Huomautus 5: Kehystä ei olisi pidettävä sellaisena, että se kattaa tällä hetkellä kaiken. Siihen sisältyy tasoilla 3, 4 ja 5 testejä, jotka ovat käytössä tai joiden validointi on kesken. Testit, joiden validointi on kesken, sisällytetään kehykseen väliaikaisesti. Kun ne on kehitetty ja validoitu, ne lisätään muodollisesti kehykseen.

Huomautus 6: Tasoa 5 ei olisi pidettävä sellaisena, että siihen sisältyy pelkästään lopullisia testejä. Kyseiseen tasoon sisältyvien testien katsotaan edistävän yleistä vaarojen ja riskien arviointia.

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445–520.

(4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

(5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785–94.

(6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530–1549

(8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550–1558.

(9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559–1567.

(10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582–587.

(11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17b-estradiol. Endocrinology 117:2229–2237.

(12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10–15.

(13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650–651.

(14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425–427.

(15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369–373.

(16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

(17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145–157.

(18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517–1525.

(19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613–620.

(20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477–485.

(21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol.20:343–347.

(22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381–393.

(23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci.37:596–601.

(24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320–333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33–41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288–305.

(30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284–291.

(31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401–416.

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1–2): 159–184.

(35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807–1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using *in vitro* assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410–1414.

(37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

(38) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta (EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33).

B.55. **ROTILLA TEHTÄVÄ HERSHBERGERIN BIOTESTI: LYHYTAIKAINEN SEULONTATESTI ANDROGEENISISTA (ANTI-ANDROGEENISISTA) OMINAISUUKSISTA**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 441 (2009). OECD aloitti vuonna 1998 korkean prioriteetin toimenpiteet, jotta voimassa olevia ohjeita tarkistetaan ja kehitetään uusia, joilla mahdollisia hormonaalisia haitta-aiheita seulotaan ja testataan (1). Yksi toimiin kuuluva osa oli rotilla tehtävän Hershbergerin biotestiä koskevan testiohjeen kehittäminen. Tätä testiä on käytetty vuosikymmeniä lääketeollisuudessa, ja sen jälkeen virallinen asiantuntijaryhmä standardoi sen ensimmäisen kerran vuonna 1962 androgeenisia kemikaaleja koskevaksi seulontavälineeksi (2). Rotilla tehtävästä Hershbergerin biotestistä on tehty vuosina 2001–2007 kattava validointiohjelma, johon sisältyi tausta-asiakirjan tekeminen (23), yksityiskohtaisia työmenetelmiä koskevan asiakirjan kerääminen (3), dissektiota koskevan oppaan laatiminen (21) ja sellaisten laajojen laboratorioiden sisäisten ja niiden välisten tutkimusten suorittaminen, joilla osoitettiin biotestin luotettavuus ja toistettavuus. Nämä validointitutkimukset suoritettiin voimakkaalla referenssiandrogeenilla (testosteroni-propionaatti, jäljempänä 'TP'), kahdella voimakkaalla synteettisellä androgeenilla (trenboloniasetaatti ja metyylitestosteroni), voimakkaalla antiandrogeenisella lääkkeellä (flutamidi), luonnollisen androgeenin (dihydrotestosteroni) voimakkaalla synteesin estäjällä (finasteridi), usealla heikolla antiandrogeenisellä torjunta-aineella (linuroni, vinklotsoliini, prokymidoni, p,p′ DDE), voimakkaalla 5-alfa-reduktaasin estäjällä (finasteridi) ja kahdella tunnetulla negatiivisella kemikaalilla (dinitrofenoli ja nonyylifenoli) (4)(5)(6)(7)(8). Tämä testimenetelmä on tulos biotestistä saadusta pitkästä kokemuksesta sekä validointitestiä koskevan ohjelman kokemuksista ja siitä saaduista tuloksista.

2. Hershbergerin biotesti on lyhytaikainen *in vivo* -seulontatesti, jossa käytetään urosten lisääntymiselimiin liittyviä kudoksia. Testi on peräisin 1930-luvulta, ja sitä mukautettiin 1940-luvulla niin, että siihen sisällytettiin urosten lisääntymiselinten androgeenille herkästi reagoivat lihakset (2)(9–15). Yli 700 mahdollista androgeenia arvioitiin 1960-luvulla käyttäen testiprotokollan standardisoitua versiota (2)(14). Androgeeneja ja antiandrogeenejä koskevien testien käyttöä pidettiin vakiomenetelmänä 1960-luvulla (2)(15). Tämä biotesti perustuu puberteetin alkuvaiheessa olevien kastroitujen urosrottien viiden androgeeniriippuvaisen kudoksen painonmuutoksiin. Siinä arvioidaan kemikaalin kykyä käynnistää biologista toimintaa, joka on yhdenmukaista androgeenivaikutuksen omaavien agonistien, antagonistien tai 5-alfa-reduktaasin estäjien kanssa. Tähän testimenetelmään sisältyvät viisi androgeeniriippuvaista kohdekudosta ovat ventraalinen eturauhanen, rakkularauhanen (sekä nesteitä ja eturauhasen etuosa), peräaukon kohottajalihas ja värvelihas, Cowperin rauhaset ja terska. Puberteetin alkuvaiheessa olevilla kastroiduilla urosrotilla kaikki nämä viisi kudosta reagoivat androgeeneihin niin, että niiden absoluuttinen paino lisääntyy. Kun näitä kudoksia stimuloidaan lisäämään painoa voimakasta referenssiandrogeenia antamalla, kaikki nämä viisi kudosta reagoivat antiandrogeeneihin niin, että niiden absoluuttinen paino vähenee. Hershbergergin biotestin päämalli on puberteetin alkuvaiheessa oleva kirurgisesti kastroitu uros, ja tämä validoitiin Hershbergerin validointiohjelman vaiheessa 1, 2 ja 3.

3. Hershbergerin biotesti on mekaaninen *in vivo* -seulontatesti androgeenivaikutuksen omaaville agonisteille, antagonisteille tai 5-alfa-reduktaasin estäjille. Sen soveltamista olisi tarkasteltava osana hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevia OECD:n käsitteellisiä puitteita (OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) (liite 2). Tässä käsitekehyksessä Hershbergedin biotesti sisältyy tasolle 3 *in vivo* -testinä, jolla tarjotaan tietoja yhdestä endokriinisesta mekanismista, androgeenisesta toiminnasta (antiadrogeenisesta toiminnasta). Se on tarkoitus sisällyttää *in vitro*- ja *in vivo* -testiryhmään, jolla tunnistetaan sisäeritysjärjestelmään mahdollisesti vaikutuksia aiheuttavat kemikaalit. Viime kädessä tehdään arviot ihmisten terveydelle tai ympäristölle aiheutuvista vaaroista ja riskeistä.

4. Kastraatiomenettelyyn liittyvien eläinten hyvinvointia koskevien huolenaiheiden vuoksi Hershbergerin biotestin vaihtoehtoiseksi malliksi, jolla vältettiin kastraatio, luotiin leikkaamatonta (kastroimatonta) stimuloitua vastavieroitettua urosta koskeva malli. Stimuloitua vastavieroitettua koskeva testimenettely validoitiin (24); validointitutkimuksissa Hershbergerin biotestin vastavieroitettua urosta koskevalla versiolla ei kuitenkaan pystytty havaitsemaan johdonmukaisesti heikkojen antiandrogeenien vaikutusta androgeeniriippuvaisten elinten painoon testatuilla annostasoillla. Sitä ei sen vuoksi sisällytetä tähän testimenetelmään. Se on kuitenkin sisällytetty OECD:n ohjeasiakirjaan 115 (25), koska se on hyödyllinen eläinten hyvinvoinnin kannalta ja sillä voidaan myös tarjota tietoja muista toimintatavoista.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

5. Androgeenivaikutuksen omaavat agonistit ja antagonistit toimivat ligandeina androgeenireseptorille, jäljempänä 'AR', ja ne voivat aktivoida tai estää reseptorin ohjaaman geenitranskription. Lisäksi jotkut kemikaalit estävät testosteronin muuttumisen voimakkaammaksi luonnolliseksi androgeeniksi dihydrotestosteroniksi joissakin androgeenien kohdekudoksissa (5-alfa-reduktaasin estäjät). Tällaiset kemikaalit voivat mahdollisesti aiheuttaa terveydelle vaaraa, myös lisääntymis- ja kehitysvaikutuksia. Siten sääntelyyn liittyvien vaatimusten vuoksi on arvioitava ja analysoitava nopeasti, voiko kemikaali toimia mahdollisesti androgeenivaikutuksen omaavana agonistina tai antagonistina taikka 5-alfa-reduktaasin estäjänä. Ligandin affiniteetti androgeenireseptoriin, mitattuna reseptoriin sitoutumisena, tai reportterigeenien transkription aktivointi *in vitro,* ei ole ainoa mahdollista vaaraa osoittava tekijä, mutta sillä tarjotaan tietoja. Muihin tekijöihin sisältyvät metaboloinnin aktivointi tai deaktivointi kehoon siirtymisen yhteydessä, kemiallinen jakautuminen kohdekudoksiin ja poistuminen kehosta. Tämän vuoksi on seulottava kemikaalin mahdollinen vaikutus *in vivo* asianmukaisten olosuhteiden ja altistumisen perusteella. *In vivo* -arviointi ei ole niin ratkaiseva, jos kemikaalin absorptiota, jakautumista, metaboloitumista ja erittymistä koskevat ominaisuudet ovat tiedossa. Androgeeniriippuvaiset kudokset reagoivat androgeenistimulointiin nopealla ja voimakkaalla kasvulla erityisesti, kun kyseessä ovat puberteetin alkuvaiheessa kastroidut urosrotat. Jyrsijälajeja, erityisesti rottia, käytetään myös laajasti myrkyllisyystutkimuksissa vaaratekijöiden kuvaamista varten. Tästä syystä testiversio, jossa käytetään puberteetin alkuvaiheessa kastroituja rottia ja viittä kohdekudosta, on asianmukainen androgeenivaikutuksen omaavien agonistien ja antagonistien sekä 5-alfa-reduktaasin estäjien *in vivo* -seulonnalle.

6. Tämä testimenetelmä perustuu sellaisiin OECD:n validointitutkimuksessa käytettyihin protokolliin, joiden on osoitettu olevan luotettavia ja toistettavia laboratorioiden sisäisissä ja niiden välisissä tutkimuksissa (4)(5)(6)(7)(8). Tässä testimenetelmässä esitetään androgeeneihin ja antiandrogeeneihin liittyvät menettelyt.

7. Vaikka eri laboratorioiden soveltamassa OECD:n Hershbergerin biotestiä koskevassa validointiohjelmassa käytetyssä TP-annoksessa oli jonkin verran vaihtelua (0,2 verrattuna 0,4 milligrammaan/painokilo/vuorokausi, ihonalainen injektio), näiden kahden testiprotokollan vaihteluvälissä ei ollut juurikaan eroa, kun kyseessä on kyky havaita heikko tai voimakas antiandrogeeninen aktiviteetti. On kuitenkin selvää, että TP-annoksen ei pitäisi olla liian suuri, jolloin heikkojen andogeenireseptorin antagonistien vaikutus estetään, tai niin pieni, että androgeeniriippuvaisissa kudoksissa esiintyy vain vähän kasvuvastetta, vaikka samaan aikaan ei annettaisi antiandrogeenia.

8. Yksittäisten androgeeniriippuvaisten kudosten kasvu ei aiheudu pelkästään androgeeneistä, eli kemikaalit, jotka ovat muita kuin androgeenivaikutuksen omaavia agonisteja, voivat muuttaa tiettyjen kudosten painoa. Kuitenkin useiden kudoksien samanaikainen kasvuvaste osoittaa androgeenispesifisemmän mekanismin. Esimerkiksi suuret annokset voimakkaita estrogeeneja voivat lisätä rakkularauhasten painoa; muissa testiin sisältyvissä androgeeniriippuvaisissa kudoksissa vaste ei ole samanlainen. Antiandrogeeniset kemikaalit voivat toimia joko androgeenireseptorin antagonisteina tai 5-alfa-reduktaasin estäjinä, ja 5-alfa-reduktaasin estäjillä on vaihteleva vaikutus, koska muuttuminen vahvempaan dihydrotestosteroniin vaihtelee kudoksen perusteella. Antiandrogeeneilla, jotka estävät 5-alfa-reduktaasin, kuten finasteridi, on voimakkaampi vaikutus ventraaliseen eturauhaseen kuin muihin kudoksiin verrattuna voimakkaaseen AR:n antagonistiin, kuten flutamidiin. Tätä kudosvastetta koskevaa eroa voidaan käyttää havaitsemaan ero AR-välitteisen ja 5-alfa-reduktaasi-välitteisen toiminnan välillä. Lisäksi androgeenireseptori liittyy kehityksellisesti muihin steroidihormoneihin, ja tietyt muut hormonit, kun niitä annetaan korkealla, suprafysiologisella annostasolla, voivat sitoa ja toimia vastaan TP:n kasvua edistäviä vaikutuksia (13). On myös mahdollista, että tehostunut steroidiaineenvaihdunta ja siitä johtuva seerumin testosteronin alentuminen voi vähentää androgeeniriippuvaisten kudosten kasvua. Tästä syystä kaikkia Hershbergerin biotestin positiivisia tuloksia olisi normaalisti arvioitava soveltamalla todistusnäyttöä koskevaa lähestymistapaa, myös *in vitro* -testejä, kuten AR:n ja estrogeenireseptorin sitoutumistestejä ja vastaavia transkription aktivointia koskevia testejä tai muita *in vivo* -testejä, joissa tarkastellaan samoja androgeenin kohdekudoksia. Näihin sisältyvät urosten puberteettia koskeva testi, 15 vuorokauden täyskasvuisia uroksia koskeva testi, taikka toistetuilla annoksilla tehdyt 28 tai 90 vuorokauden testit.

9. Kokemus osoittaa, että ksenobioottiset androgeenit ovat harvinaisempia kuin ksenobioottiset antiandrogeenit. Siten oletetaan, että Hershbergerin biotestiä käytetään useimmiten antiandrogeenien seulontaan. Androgeenien testaamista koskevaa menettelyä voitaisiin kuitenkin suositella steroideille tai steroidien kaltaisille kemikaaleille, taikka kemikaaleille, joiden indikaatio mahdollisista androgeenisista vaikutuksista on peräisin käsitekehyksen tasoon 1 tai 2 sisältyvistä menettelyistä (liite 2). Samoin androgeenisiin (antiandrogeenisiin) ominaisuuksiin liittyviä haittavaikutuksia voidaan havainnoida tason 5 testeissä, mikä johtaa tarpeeseen arvioida, toimiiko kemikaali endokriinisella vaikutustavalla.

10. On todettava, että kaikkien eläimiin perustuvien menettelyiden on täytettävä paikalliset eläinten hoitoa koskevat vaatimukset; jäljempänä esitetyt kuvaukset hoidosta ja käsittelystä ovat toimintaa koskevia vähimmäisvaatimuksia, ja ne korvataan paikallisilla säännöksillä, kuten tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 22 päivänä syyskuuta 2010 annetulla Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 2010/63/EU (26). OECD antaa lisäohjeita eläinten inhimillisestä kohtelusta (17).

11. Kuten kaikissa biotesteissä, joissa käytetään koe-eläimiä, olisi harkittava huolellisesti, onko tutkimuksen suorittaminen tarpeen. Tällaiseen päätökseen voi olla kaksi syytä:

— korkea altistuspotentiaali (käsitekehyksen taso 1) tai osoitukset androgeenisestä vaikutuksesta (antiandrogeenisyydesta) (taso 2), jolla tuetaan tutkimusta siitä, voivatko vaikutukset esiintyä *in vivo*

— androgeenivaikutusten (antiandrogeenivaikutusten) kanssa yhdenmukaiset vaikutukset tason 4 ja 5 *in vivo* -testeissä tukevat tutkimuksia tietystä vaikutustavasta, esim. määritystä siitä, johtuvatko vaikutukset androgeenisesta (antiandrogeenisesta) mekanismista.

12. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät esitetään liitteessä 1.

TESTIN PERIAATE

13. Hershbergerin biotestin herkkyys saavutetaan käyttämällä uroksia, jotka tuottavat mahdollisimman vähän endogeenista androgeenia. Tämä voidaan toteuttaa käyttämällä kastroituja uroksia. Kastraation jälkeen kohdekudoksilla on ollut riittävästi aikaa kutistua minimiin, ja samantasoinen lähtöpaino on otettu huomioon. Seulottaessa mahdollista androgeenista toimintaa eläimen endogeenisen androgeenin taso on alhainen ja hypotalamusta, aivolisäkettä ja sukupuolirauhasia koskevaa akselia on estetty kompensoimasta tätä palautemekanismeilla, kudosten vastekykyä on maksimoitu ja kudosten painonvaihtelua kokeen alussa on vähimmäistetty. Seulottaessa mahdollista antiandrogeenista toimintaa, johdonmukaisempi kudosten painonnousu voidaan saada aikaan, kun kudoksia stimuloidaan referenssiandrogeenilla. Siten Hershbergerin biotestiin tarvitaan vain kuusi eläintä annosryhmää kohti, kun muissa testeissä, joissa käytetään leikkaamattomia puberteettivaiheessa olevia tai täysikasvuisia uroksia, suositellaan käyttämään 15 urosta annosryhmää kohti.

14. Puberteetin alkuvaiheessa olevien urosrottien kastraatio olisi toteuttava asianmukaisesti käyttämällä hyväksyttyä anestesiamenetelmää ja aseptista tekniikkaa. Kipulääke annetaan ensimmäisinä päivinä leikkauksen jälkeen leikkauksen jälkeisten vaivojen poistamiseksi. Kastraatio tehostaa testin tarkkuutta havaita heikot androgeenit ja antiandrogeenit, koska leikkaamattoman eläimen kompensoiva endokriininen palautemekanismi, joka voi lievittää annettujen androgeenien ja antiandrogeenien vaikutusta, poistetaan ja koska merkittävä yksilöiden välinen seerumin testosteronin tason vaihtelu poistetaan. Kastraatiolla vähennetään siten tällaisen endokriinisen toiminnan seulontaan tarvittavien eläinten määrää.

15. Kun seulotaan mahdollista androgeenista toimintaa, testikemikaalia annostellaan päivittäin suun kautta letkulla tai ihonalaisella injektiolla 10 peräkkäisen päivän ajan. Testikemikaali annetaan vähintään kahdelle koe-eläinten koeryhmälle käyttäen yhtä annostasoa ryhmää kohti. Koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus noin 24 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta. Kaikki tilastollisesti merkittävät kahden tai useamman kohde-elimen painonnousut testikemikaalia saavassa ryhmässä verrattuna kantaja-ainetta saavaan kontrolliryhmään, merkitsevät, että testikemikaali on mahdollisen androgeenisen toiminnan osalta positiivinen (ks. 60 kohta). Trenbolonin kaltaisilla androgeeneilla, jotka eivät voi olla 5-alfa-reduktaasin estäjiä, on vahvempia vaikutuksia peräaukon kohottajalihakseen ja värvelihakseen sekä terskaan TP:hen verrattuna, mutta kaikkien kudosten kasvun pitäisi lisääntyä.

16. Seulottaessa mahdollista androgeenista toimintaa testikemikaali annostellaan päivittäin suun kautta letkulla tai ihonalaisella injektiolla 10 peräkkäisen päivän ajan yhdessä TP-annosten kanssa (0,2 tai 0,4 mg/kg/vuorokausi) ihonalaisella injektiolla. Validointiohjelmassa määriteltiin, että TP:tä voidaan käyttää joko 0,2 tai 0,4 mg/kg/vuorokausi, koska kummatkin annokset olivat tehokkaita antiandrogeenien havaitsemisessa ja sen vuoksi testiin olisi

valittava ainoastaan yksi annos. Testikemikaalin porrastetut annokset annetaan vähintään kolmelle koe-eläinten koeryhmille käyttäen yhtä annostasoa ryhmää kohti. Koe-eläimille suoritetaan ruumiinavaus noin 24 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta. Kaikki tilastollisesti merkittävät kahden tai useamman kohde-elimen painonnousut testattavaa kemikaalia ja TP:tä saavassa ryhmässä verrattuna pelkästään TP:tä saavaan kontrolliryhmään, merkitsevät, että testikemikaali on mahdollisen androgeenisen toiminnan osalta positiivinen (ks. 61 kohta).

MENETELMÄN KUVAUS

Eläinlajin ja kannan valinta

17. Rottia on käytetty tavallisesti Hershbergerin biotestissä 1930-luvulta lähtien. Vaikka on biologisesti mahdollista, että rottien ja hiirten käytöstä saataisiin samanlaisia vastauksia, rottamallista saadun 70 vuoden kokemuksen perusteella Hershbergerin biotestin lajiksi on valittu rotta. Lisäksi, koska Hershbergerin biotesti voidaan tehdä ennen pitkäaikaista monen sukupolven tutkimusta, kummassakin tutkimuksessa on käytettävä samaa eläinlajia, kantaa ja toimituslähdettä.

18. Laboratoriot voivat valita tämän protokollan perusteella testissä käytettävän rottakannan. Sen pitäisi yleensä olla kanta, jota on käytetty aikaisemmin testin suorittavassa laboratoriossa. Testiin voidaan käyttää laboratoriossa yleisesti käytettyjä rottakantoja; kuitenkin, kantoja, jotka kehittyvät huomattavasti 42 päivän ikää myöhemmin, ei pitäisi käyttää, koska näiden urosten kastrointi 42 päivän iässä voi estää terskan painon mittaamisen. Tämä voidaan tehdä ainoastaan sen jälkeen, kun esinahka eroaa peniksestä. Tästä syystä Fisher 344 -rotista johdettuja kantoja ei pitäisi käyttää harvinaisia tapauksia lukuun ottamatta. Fisher 344 -rotalla on erilainen seksuaalisen kehityksen ajoitus muihin yleisemmin käytettyihin kantoihin, kuten Sprague Dawley ja Wistar, nähden (16). Jos tällaista kantaa käytetään, laboratorion pitäisi kastroida ne jonkin verran myöhäisemmässä iässä, ja sen olisi voitava osoittaa käytetyn kannan testiherkkyys. Laboratorion olisi esitettävä selkeästi perustelut rottakannan valinnalle. Mikäli seulontatesti suoritetaan ennen oraalista toistuvan annostelun tutkimusta, lisääntymis- ja kehitystutkimusta tai pitkäaikaista tutkimusta, kaikissa kokeissa on käytettävä mieluiten samasta kannasta ja lähteestä olevaa eläintä.

Koe-eläinten häkit ja ruokinta

19. Kaikkien toimenpiteiden olisi oltava eläinten hoitoa koskevien paikallisten vaatimusten mukaisia. Nämä kuvaukset hoidosta ja käsittelystä ovat vähimmäisvaatimuksia, ja ne korvataan tiukemmilla paikallisilla säännöksillä, kuten tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 22 päivänä syyskuuta 2010 annetulla Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 2010/63/EU (26). Koe-eläinhuoneen lämpötilan pitäisi olla 22 °C (se voi vaihdella noin ± 3 °C). Suhteellinen kosteus on vähintään 30 % eikä mielellään ylitä 70:tä % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana. Tavoitteena on 50–60 %:n suhteellinen kosteus. Huoneessa tulee käyttää keinovalaistusta. Valaistusta olisi käytettävä jaksossa 12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää.

20. Usean eläimen ryhmä on parempi kuin yksin pitäminen, koska eläimet ovat nuoria ja rotat ovat sosiaalisia eläimiä. Kahden tai kolmen eläimen pitämisellä häkissä vältetään tilanahtaus ja siihen liittyvä stressi, joka voi häiritä lisäsukupuolirauhasten kudoksien kehityksen hormonaalista kontrollia. Häkit puhdistetaan kauttaaltaan ja mahdolliset epäpuhtaudet poistetaan. Häkit sijoitetaan siten, että niiden sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Sopivan kokoinen häkki (~ 2 000 neliösenttimetriä) estää tilanahtauden.

21. Kukin eläin olisi tunnistettava yksilöllisesti (esim. korvamerkillä tai muulla merkinnällä) käyttäen inhimillistä menetelmää. Tunnistustapa on kirjattava.

22. Laboratorioruokintaa ja juomaveden määrää ei saa rajoittaa. Hersbergerin biotestiä suorittavien laboratorioiden olisi käytettävä laboratorioruokavaliota, jota käytetään tavallisesti, kun ne testaavat kemikaaleja. Biotestiä koskevissa validointitesteissä ei havaittu, että ruokavaliolla olisi ollut vaikutuksia tai se olisi aiheuttanut vaihtelua. Käytetty ravinto kirjataan ja näyte laboratorioravinnosta olisi säilytettävä mahdollista myöhempää analyysia varten.

Androgeeniriippuvaisten elinten painoa koskevat suorituskriteerit

23. Validointitutkimuksen aikana ei esiintynyt näyttöä siitä, että ruumiinpainon laskeminen lisäsi tai vähensi kohdekudosten (eli niiden, joita tässä tutkimuksessa punnitaan) kudospainon lisääntymistä.

24. Validointiohjelmassa menestyksekkäästi käytettyjen eri rottakantojen androgeeniriippuvaisten elinten paino on painavammilla rottakannoilla suurempi kuin kevyemmillä. Tästä syystä Hershbergerin biotestin suorituskriteereihin eivät sisälly absoluuttiset odotettavissa olevat elinten painot positiivista ja negatiivista kontrollia varten.

25. Koska kudoksen variaatiokertoimella on vastakkainen suhde tilastollisen voiman kanssa, Hershbergerin biotestin suorituskriteerit perustuvat kunkin kudoksen variaatiokertoimen maksimiarvoihin (taulukko 1). Variaatiokertoimet ovat peräisin OECD:n validointitutkimuksista. Laboratorioiden olisi tarkasteltava negatiivisten vaikutusten osalta kontrolliryhmän ja korkean annoksen koeryhmän variaatiokertoimia sen määrittelemiseksi, onko variaatiokertoimen maksimiarvoja koskevat suorituskriteerit ylitetty.

26. Tutkimus olisi toistettava, jos: 1) kolme tai useampi kymmenestä mahdollisesta yksittäisestä variaatiokertoimesta kontrolliryhmässä ja korkean annoksen koeryhmässä ylittää agonisteja ja antagonisteja koskeville tutkimuksille taulukossa 1 osoitetun enimmäisarvon, tai 2) ainakin kaksi kohdekudosta on vähämerkityksistä, eli niiden r-arvo on 0,05–0,10.

Taulukko 1

Suurimpien sallittujen variaatiokertoimien määritteleminen lisäsukupuolirauhasten kohdekudoksille kastroitua eläintä koskevassa mallissa OECD:n validointitutkimuksissa [1]

Kudos	Antiandrogeeniset vaikutukset	Androgeeniset vaikutukset
Rakkularauhaset	40 %	40 %
Ventraalinen eturauhanen	40 %	45 %
Peräaukon kohottajalihas ja värvelihas	20 %	30 %
Cowperin rauhaset	35 %	55 %
Terska	17 %	22 %

TESTIN SUORITTAMINEN

Sääntelyn noudattaminen ja laboratorioiden pätevyyden varmistaminen

27. Toisin kuin kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskevassa testissä (tässä liitteessä oleva B.54 luku), Hershbergerin testissä laboratorioiden pätevyyttä ei tarvitse osoittaa ennen tutkimuksen aloittamista, koska rinnakkaisten positiivisten (testosteroni-propionaatti ja flutamidi) ja negatiivisten kontrollien suorittaminen on olennainen osa testiä.

Eläinten lukumäärä ja kunto

28. Kuhunkin koe- ja kontrolliryhmään pitäisi sisältyä ainakin kuusi eläintä. Tämä koskee androgeeni- ja antiandrogeenivaikutusta koskevia protokollia.

Kastrointi

29. Eläinten totutusvaiheen olisi kestettävä usean päivän ajan eläinten vastaanottamisesta, jotta varmistetaan, että ne ovat terveitä ja menestyvät. Koska 42 päivän ikää tai syntymän jälkeistä päivää 42 ennen kastroitujen eläinten esinahka ei ole mahdollisesti eronnut terskasta, eläimet olisi kastroitava syntymän jälkeisenä päivänä 42 tai sen jälkeen, ei aiemmin. Eläimet kastroidaan nukutettuina siten, että niiden kivespussiin tehdään viilto, kummatkin kivekset ja lisäkivekset poistetaan, ja verisuonet sekä siemenjohtimet sidotaan. Kivespussi suljetaan ompeleella tai hakasilla sen jälkeen, kun on varmistettu, ettei verenvuotoa esiinny. Eläimille olisi annettava kipulääkettä ensimmäisinä päivinä leikkauksen jälkeen mahdollisten vaivojen lievittämiseksi. Jos kastroidut eläimet hankitaan toimittajalta, sen on taattava eläinten ikä ja sukukypsyyden vaihe.

[1] Tietyn kudoksen variaatiokertoimen kynnysarvo tunnistettiin variaatiokertoimen arvoja koskevasta kaaviokuvasta — joka on järjestetty pienimmästä peräkkäin suurimpaan — kaikkien validointiohjelman kokeiden kaikille keskiarvoille käyttäen tiettyä mallia (agonisti tai antagonisti). Variaatiokertoimen kynnysarvo luetaan siitä pisteestä, kun lisäykset seuraavaan suurempaan variaatiokertoimeen sarjassa ovat huomattavasti suurempia kuin muutamat edeltävät variaatiokertoimet — raja-arvo. Olisi pantava merkille, että vaikka tässä analyysissa todettiin melko luotettavia raja-arvoja testin antagonisteja koskevalle mallille, variaatiokertoimen agonisteja koskevan testin käyrät osoittivat tasaisemman lisäyksen, jolloin tällä menettelyllä tunnistettava kynnysarvio on jokseenkin sattumanvarainen.

Totutus kastraation jälkeen

30. Eläinten pitäisi voida jatkaa tottumista laboratorio-olosuhteisiin vähintään seitsemän päivän ajan kastraatiosta, jotta kohdekudosten paino voisi palautua. Eläimiä on tarkkailtava päivittäin, ja kaikki eläimet, joilla on merkkejä taudista tai fyysisistä poikkeavuuksista, on poistettava. Käsittely voidaan siten aloittaa (tutkittavan aineen) annostelun aloittamisella jo syntymän jälkeisenä päivänä 49, mutta viimeistään päivänä 60. Eläimen ikä ei saisi olla ruumiinavauksessa myöhempi kuin syntymän jälkeinen päivä 70. Laboratorio voi tämän joustavuuden ansiosta ajoittaa kokeet tehokkaasti.

Ruumiinpaino ja satunnaisotos ryhmässä

31. Eri eläinten ruumiinpainon erot aiheuttavat vaihtelua kudospainossa eläinryhmien sisällä ja niiden välillä. Kudospainon vaihtelun lisääminen johtaa korkeampaan variaatiokertoimeen ja vähentää testin tilastollista voimaa (eli testiherkkyyttä). Sen vuoksi ruumiinpainon vaihtelua olisi hallittava kokeellisesti ja tilastollisesti.

32. Kokeellinen hallinta merkitsee, että tutkimusryhmien sisällä ja niiden välillä aiheutetaan pientä ruumiinpainon vaihtelua. Ensinnäkin epätavallisen pieniä tai suuria eläimiä olisi vältettävä ja niitä ei pitäisi sijoittaa tutkimusryhmiin. Tutkimuksen alkaessa eläinten paino saa vaihdella korkeintaan ± 20 % tavanomaisesta keskiarvosta (esim. 175 g ± 35 g puberteetin alkuvaiheessa kastroitujen rottien osalta). Toiseksi eläimet pitäisi jakaa ryhmiin (kontrolli- ja koeryhmiin) satunnaisen painojakauman mukaisesti, jotta minkään ryhmän keskimääräinen ruumiinpaino ei poikkea tilastollisesti muista ryhmistä. Sovellettu ryhmän satunnaisotosta koskeva menettely on kirjattava.

33. Koska toksisuus saattaa vähentää koeryhmien ruumiinpainoa kontrolliryhmiin verrattuna, tilastollisena kovariantina voidaan käyttää testikemikaalin ensimmäistä annospäivää, ei ruumiinpainoa ruumiinavauksessa.

Annostasot

34. Sen määrittämiseksi, voiko testikemikaalilla olla androgeenivaikutusta *in vivo*, yleensä riittää kaksi testikemikaalia saavaa annosryhmää sekä positiivinen ja kantaja-aineakontrolli (negatiivinen kontrolli) (ks. 43 kohta). Tätä mallia pidetään parempana eläinten hyvinvointiin liittyvistä syistä. Jos tarkoituksena on annosvastekäyrän saaminen tai ekstrapolointi alempiin annoksiin, tarvitaan ainakin kolme annosryhmää. Jos tarvitaan androgeeniaktiivisuuden tunnistamista laajempia tietoja (kuten arviota kemikaalin voimakkuudesta), olisi harkittava erilaista annostusta. Antiandrogeeneja koskevan testin osalta testikemikaali annostellaan yhdessä referenssiandrogeenin vaikutuksen omaavan agonistin kanssa. Olisi käytettävä vähintään kolmea koeryhmää, joille annetaan erilaiset annokset testikemikaalia, ja positiivista ja negatiivista kontrollia (ks. 44 kohta). Kontrolliryhmän eläimiä käsitellään aivan samoin kuin koeryhmän eläimiä, paitsi että niille ei anneta testikemikaalia. Jos kantaja-ainetta käytetään testikemikaalin annon yhteydessä, kontrolliryhmän pitäisi saada korkein määrä koeryhmissä käytettyä kantaja-ainetta.

35. Kaikki annostasot olisi ehdotettava ja valittava niin, että otetaan huomioon testikemikaalista tai siihen liittyvistä materiaaleista mahdollisesti saatavilla olevat toksisuustiedot ja kineettiset (toksikokineettiset) tiedot. Suurimman annostason osalta olisi ensiksi otettava huomioon LD_{50} (puolet tappava annos) ja/tai välitöntä myrkyllisyyttä koskevat tiedot, jotta eläinten kuolema, merkittävä kärsiminen tai tuska vältetään (17)(18)(19)(20), ja toiseksi olisi otettava huomioon saatavilla olevat subkroonisissa ja kroonisissa tutkimuksissa käytetyt annostiedot. Yleensä suurimman annoksen ei pitäisi aiheuttaa sitä, että eläinten lopullinen ruumiinpaino laskee yli 10 % kontrollipainosta. Suurimman annoksen pitäisi olla joko 1) suurin annos, jolla varmistetaan eläimen selviytyminen ja se, että se ei aiheuta merkittäviä toksisuusvaikutuksia tai kärsimystä eläimille kemikaalin antoa seuraavana 10 peräkkäisenä päivänä, jolloin suurin annos on 1 000 mg/kg/päivä (ks. 36 kohta); tai 2) annos, joka aiheuttaa androgeenisia (antiandrogeenisia) vaikutuksia, riippuen siitä, kumpi annos on pienempi. Suojelutoimenpiteenä pitkät välit, esim. puoli logaritmiyksikköä (joka vastaa annoslisäystä, jonka kerroin on 3,2) tai jopa yhden logaritmiyksikön verran annosten välillä, ovat hyväksyttäviä. Jos soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, voidaan tehdä annoksenmääritystutkimus, (ks. 37 kohta), jonka perusteella käytettävät annokset voidaan määrittää.

Raja-annostaso

36. Jos testissä, jonka raja-annos on 1 000 mg/painokilo/vuorokausi ja jonka alhaisempaan annokseen sovelletaan tässä tutkimuksessa kuvattuja menettelyjä, ei voida tuottaa lisääntymiselinten painolle tilastollisesti merkittävää muutosta, täydentäviä annostasoja voidaan pitää tarpeettomina. Raja-annosta sovelletaan paitsi silloin, kun ihmisten altistumista koskevat tiedot osoittavat, että korkeampi annostaso on tarpeellinen.

Annoksenmääritystä koskevat näkökohdat

37. Alustava annoksenmääritystä koskeva tutkimus voidaan suorittaa tarvittaessa muutamalla eläimellä asianmukaisten annosryhmien valitsemiseksi (tässä käytetään välitöntä myrkyllisyyttä koskevien testien menettelyitä (tämän liitteen B.1 a ja B.1 b luku (27), OECD:n testiohje 425 (19))). Hershbergerin biotestin tavoitteena on valita annokset niin, että eläimen selviytyminen varmistetaan ja että niihin ei sisälly merkittävää toksisuutta tai ne eivät aiheuta eläimille kärsimystä kemikaalin antoa seuraavana kymmenenä peräkkäisenä päivänä, jolloin suurin annos on 1 000 mg/kg/päivä, kuten todetaan 35 ja 36 kohdassa. Tältä osin OECD:n ohjeasiakirjaa (17) voidaan käyttää määrittelemään sellaisten kliinisten oireiden esiintyminen, jotka viittaavat toksisuuteen tai eläimelle aiheutuvaan kärsimykseen. Mahdollisuuksien mukaan tässä annoksenmääritystutkimuksessa voidaan kolmen päivän jälkeen annoksen antamisesta leikata kohdekudokset ja punnita ne noin 24 tuntia viimeisen annoksen antamisen jälkeen. Näitä tietoja voidaan sen jälkeen käyttää varsinaisen tutkimuksen annostuksen suunnitteluun.

Vertailukemikaalit ja kantaja-aine

38. Vertailuun käytetyn androgeenivaikutuksia aiheuttavan agonistin olisi oltava testosteroni-propionaatti (TP) CAS-nro 57-82-5. Vertailuun käytetty TP-annos voi olla joko 0,2 tai 0,4 mg/painokilo/vuorokausi. Vertailuun käytetyn androgeenivaikutuksia aiheuttavan antagonistin olisi oltava flutamidi (FT), CAS-nro No 1311-84-7. Vertailuun käytetyn flutamidiannoksen olisi oltava 3 mg/painokilo/vuorokausi, ja flutamidi olisi annettava samaan aikaan vertailuun käytetyn TP-annoksen kanssa.

39. Vesipitoisen liuoksen/suspension käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Koska useimmat androgeenien ligandit tai niiden metaboliset prekursorit ovat yleensä hydrofobisia, yleisin menettelytapa on öljypohjaisen liuoksen/suspension käyttö (esimerkiksi maissi-, pähkinä-, seesami- tai oliiviöljy). Testikemikaalit voidaan liuottaa pieneen määrään 95-prosenttista etanolia tai muihin soveltuviin liuottimiin, ja niitä voidaan laimentaa lopulliseen pitoisuuteen kantaja-aineessa. Liuottimen myrkyllisyysominaisuudet on oltava tiedossa, ja niitä olisi testattava erillisen ainoastaan liuotinta sisältävän kontrolliryhmän avulla. Jos testikemikaalia pidetään stabiilina, sen liuottamisen edistämiseksi voidaan käyttää varovaista lämmitystä ja voimakkaita mekaanisia toimenpiteitä. Testattavan kemikaalin stabiliteetti kantaja-aineessa määritetään. Jos testikemikaali on stabiili koko tutkimuksen ajan, voidaan valmistaa yksi alkuerä testikemikaalia, ja määritelty annos laimennoksia valmistetaan päivittäin. On huolehdittava, että näytteisiin ei pääse epäpuhtauksia ja että ne eivät pilaannu.

Antotapa

40. TP:tä annostellaan ihonalaisella injektiolla ja FT:tä suun kautta letkulla.

41. Testikemikaali annostellaan suun kautta letkulla tai ihonalaisella injektiolla. Antotavan valinnassa on otettava huomioon eläinten hyvinvointiin liittyvät näkökohdat ja testikemikaalin fyysiset/kemialliset ominaisuudet. Ennen kuin aloitetaan laaja pitkäaikainen testaus — jos injektiolla on saatu jo positiivisia tuloksia –, on otettava huomioon toksikologiset näkökohdat, kuten se, mikä merkitys on reitillä, jota kautta ihminen altistuu kemikaalille (esim. suuletkua käytetään mallina aineen nautinnan suhteen, ihonalaista injektiota hengitysteiden tai ihoadsorption suhteen), ja olemassa olevat toksikologiset tiedot metaboloitumisesta ja kinetiikasta (esim. tarve välttää ensikierron metabolia, parempi tehokkuus tietyn reitin välityksellä).

42. Eläinten olisi saatava annos samalla tavoin ja samassa aikajärjestyksessä kymmenen peräkkäisen päivän aikana noin 24 tunnin välein. Annostasoa olisi mukautettava joka päivä samanaikaisesti suoritettavan päivittäisen ruumiinpainon mittauksen perusteella. Annoksen tilavuus ja antoajankohta olisi kirjattava jokaisena altistuspäivänä. Tietojen asianmukaisen arvioinnin varmistamiseksi on pidettävä huolta, että 35 kohdassa tarkoitettua suurinta annosta ei ylitetä. Tältä osin olisi perusteellisesti arvioitava ruumiinpainon alentumista, kliinisiä oireita ja muita havaintoja. Letkuruokinnassa olisi käytettävä mahaletkua tai sopivaa intubaatiokanyylia. Suurin kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Olisi noudatettava paikallisia eläinten hoitoa koskevia vaatimuksia, mutta nestemäärän tilavuus ei saa ylittää 5 ml/painokilo. Poikkeuksen muodostavat vesiliuokset, joita käytettäessä tilavuus voi olla 10 ml/painokilo. Ihonalaisten injektioiden osalta annokset olisi annettava lapaluun taakse tai lantion alueelle steriilillä neulalla (esim. 23 tai 25 gaugen neula) ja tuberkuliiniruiskulla. Pistokohdan ajeleminen on vapaaehtoista. Kaikki annosvajaukset ja vuodot pistoskohdassa tai puutteellinen annostus olisi kirjattava. Päivittäin rottaan injektoitavan nestemäärän kokonaistilavuus ei saa ylittää 0,5:tä ml/painokilo.

Androgeenovaikutuksia omaavia agonisteja koskevat erityiset menettelyt

43. Androgeenivaikutuksia omaavia agonisteja koskevan testi osalta kantaja-ainetta saanut ryhmä muodostaa negatiivisen kontrollin ja TP:tä saanut ryhmä positiivisen kontrollin. Androgeenivaikutuksia omaavien agonistien kanssa yhdenmukaista biologista toimintaa testataan antamalla koeryhmille testikemikaalia valittu annos kymmenen peräkkäisen päivän ajan. Testikemikaalia saaneiden ryhmien viiden lisäsukupuolirauhasen kudoksen painoa verrataan kantaja-ainetta saaneeseen ryhmään tilastollisesti merkittävän painonlisäyksen arvioimiseksi.

Androgeenivaikutuksen omaavia antagonisteja ja 5-alfa-reduktaasin estäjiä koskevat erityiset menettelyt

44. Androgeenivaikutuksen omaavia antagonisteja ja 5-alfa-reduktaasin estäjiä koskevan testin osalta TP:tä saanut ryhmä muodostaa negatiivisen kontrollin, ja TP:n ja FT:n vertailuannoksia samanaikaisesti saanut ryhmä muodostaa positiivisen kontrollin. Androgeenivaikutuksen omaavien antagonistien ja 5-alfa-reduktaasin estäjien kanssa yhdenmukaista biologista toimintaa testataan antamalla TP:ta vertailuannos ja antamalla testikemikaalia kymmenen peräkkäisen päivän ajan. TP:tä ja testikemikaalia saaneiden ryhmien viiden lisäsukupuolirauhasen kudoksen painoa verrataan pelkästään TP:tä saaneeseen ryhmään tilastollisesti merkittävän painon vähentymisen arvioimiseksi.

Tarkkailu

Kliiniset havainnot

45. Yleiset kliiniset havainnot olisi tehtävä vähintään kerran päivässä ja useammin, jos havaitaan toksisuusoireita. Havaintoja olisi tehtävä mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Kaikkia eläimiä tarkkaillaan niin, että huomiota kiinnitetään kuolleisuuteen, sairastuvuuteen ja yleisiin kliinisiin oireisiin, kuten muutoksiin käyttäytymisessä, ihon, turkin, silmien, limakalvojen eritteiden erityksen sekä autonomisen hermoston toimintaan (esim. kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, poikkeava hengitys).

46. Kaikki kuolleena löytyneet eläimet olisi poistettava ja hävitettävä, ja tietoja ei tarvitse analysoida. Kaikki ennen ruumiinavausta kuolleet eläimet olisi sisällytettävä tutkimustietoihin mukaan lukien ilmeiset kuolinsyyt. Kaikki kuolemaisillaan olevat eläimet olisi lopetettava inhimillisellä tavalla. Kaikki kuolemaisillaan olleet ja myöhemmin lopetetut eläimet olisi sisällytettävä tutkimustietoihin mukaan lukien ilmeiset kuolinsyyt.

Eläimen paino ja ravinnon kulutus

47. Kaikki eläimet olisi punnittava lähimpään 0,1 grammaan. Punnitus aloitetaan juuri ennen kokeen aloittamista, eli kun eläimet jaetaan ryhmiin. Valinnaisena mittana voidaan käyttää altistusjakson aikana kulutetun ravinnon määrää, joka voidaan mitata häkkiä kohti punnitsemalla annostelulaitteet. Ravinnon kulutuksesta saadut tulokset olisi ilmoitettava grammoina rottaa kohti päivässä.

Dissektio sekä kudosten ja elinten painon mittaaminen

48. Noin 24 tunnin kuluttua testikemikaalin viimeisestä annoksesta rotat lopetetaan ja veri poistetaan testin suorittavan laboratorion tavanomaisten menettelyjen mukaisesti, ja ruumiinavaus suoritetaan. Laboratorioraporttiin on merkittävä eläimen inhimilliseen lopettamiseen käytetty menetelmä.

49. Ihannetapauksessa ruumiinavausjärjestys satunnaistetaan ryhmien välillä. Näin vältetään eteneminen suoraan ylös tai alaspäin annosryhmiä, mikä voi vaikuttaa tietoihin. Kaikki ruumiinavauksen löydökset, eli patologiset muutokset ja näkyvät vauriot, kirjataan ja raportoidaan.

50. Viisi androgeeniriippuvaista kudosta (ventraalinen eturauhanen, rakkularauhanen, peräaukon kohottajalihas ja värvelihas, Cowperin rauhaset ja terska) olisi punnittava. Nämä kudokset irrotetaan, niihin tarttunut ylimääräinen kudos ja rasva poistetaan, ja niiden käsittelemätön paino (ilman fiksointia) määritetään. Kaikkia kudoksia käsitellään varovaisesti, jotta vältetään nesteen valuminen pois ja kuivuminen, mikä saattaa aiheuttaa merkittäviä virheitä

ja vaihtelua, koska tämä vähentää kirjattavaa painoa. Useat kudokset voivat olla erittäin pieniä tai niitä on vaikea leikata. Tämä lisää vaihtelua. Tästä syystä on tärkeää, että lisäsukupuolirauhasten kudoksen leikkaamisen suorittavat henkilöt ovat tietoisia näiden kudosten dissektiota koskevista vakioiduista toimintamenettelyistä. OECD on asettanut saataville oppaan kudosten dissektiota koskevista vakioiduista toimintaohjeista (21). Näiden ohjeiden mukaisella perusteellisella koulutuksella vähimmäistetään tutkimuksen mahdolliset vaihtelun syyt. Ihannetapauksessa saman näytteiden leikkaajan olisi oltava vastuussa tietyn kudoksen irrottamisesta. Näin poistetaan kudosten käsittelyyn liittyvät näytteiden leikkaajista johtuvat erot. Jos tämä ei ole mahdollista, ruumiinavaus olisi suunniteltava siten, että kukin kudoksen leikkaaja irrottaa tietyn kudoksen kaikista koeryhmistä sen sijaan, että yksi henkilö irrottaa kaikki kudokset kontrolliryhmästä ja toinen kemikaalia saaneista ryhmistä. Kaikki lisäsukupuolirauhasten kudokset olisi punnittava kuivaamatta lähimpään 0,1 milligrammaan, ja kunkin eläimen kudoksien painot olisi kirjattava.

51. Useat kudokset voivat olla erittäin pieniä tai niitä on vaikea leikata. Tämä lisää vaihtelua. Aikaisemmissa tutkimuksissa on käynyt ilmi monia variaatiokertoimia, jotka vaikuttavat eroavan laboratorioiden pätevyyden perusteella. Joissain tapauksissa on havaittu suuria eroja tiettyjen kudosten, kuten ventraalisen eturauhasen ja Cowperin rauhasten absoluuttisissa painoissa tietyssä laboratoriossa.

52. Maksan, munuaisten ja lisämunuaisten paino ovat vapaaehtoisia mittauksia. Ylimääräinen rasva ja sidekudos olisi puhdistettava pois kudoksista. Maksa olisi punnittava lähimpään 0,1 grammaan. Munuaiset ja lisämunuaiset olisi punnittava ja kirjattava lähimpään 0,1 grammaan. Maksaan, munuaisiin ja lisämunuaisiin eivät vaikuta pelkästään androgeenit; niillä tarjotaan hyödyllisiä tietoja systeemisestä toksisuudesta.

53. Seerumin luteinisoivan hormonin, jäljempänä 'LH-hormoni', follikkelia stimuloivan hormonin, jäljempänä 'FSH-hormoni', ja testosteronin, jäljempänä 'T', mittaaminen on vapaaehtoista. Seerumin T-tasot ovat hyödyllisiä sen määrittämiseksi, kiihdyttääkö testikemikaali testosteronin maksametaboliaa alentamalla seerumitasoa. Ilman T-tietoja, tällainen vaikutus näyttää aiheutuvan antiandrogeenisen mekanismin välityksellä. LH-hormonin tasoilla tarjotaan tietoa siitä, voiko tietty antiandrogeeni vähentää elimen painoa ja sen lisäksi vaikuttaa hypotalamuksen ja aivolisäkkeen toimintaan, mikä voi pitkän aikavälin tutkimuksissa aiheuttaa kasvaimia kiveksissä. FSH-hormoni on tärkeä siittiöiden muodostumisen kannalta. Seerumit T4 ja T3 ovat myös vapaaehtoisia kokeita, joilla tarjotaan hyödyllistä lisätietoa kyvystä häiritä kilpirauhashormonin homeostaasia. Jos hormonimittauksia tehdään, rotat olisi nukutettava ennen ruumiinavausta ja veri olisi otettava sydänpunktiolla. Nukutusmenetelmä olisi valittava huolella, jotta se ei vaikuta hormonimittaukseen. Seerumin valmistusmenetelmä, radioimmunoanalyysin tai muiden mittausmenetelmien lähde, analyyttiset menetelmät ja tulokset olisi kirjattava. LH-hormonin tasot olisi ilmoitettava nanogrammoina millilitraa kohti seerumissa, ja myös T olisi ilmoitettava nanogrammoina millilitraa kohti seerumissa.

54. Kudosten irrottamista kuvataan seuraavassa, ja tähän liittyy yksityiskohtainen kudosten dissektiota koskeva opas ja valokuvat, jotka julkaistaan validointiohjelmassa täydentävänä aineistona (21). Kudosten irrottamista koskeva video on saatavilla myös Korean elintarvike- ja lääkehallinnon (Food and Drug Administration) verkkosivulla (22).

— Kun eläin on vatsanpuoleinen puoli ylöspäin, määritä, onko peniksen esinahka eronnut terskasta. Jos on, esinahka vedetään taaksepäin ja terska poistetaan ja punnitaan (lähimpään 0,1 milligrammaan), ja paino kirjataan.

— Vatsanahka ja -seinämä avataan, jolloin sisälmykset ovat näkyvissä. Jos valinnaiset elimet punnitaan, maksa poistetaan ja punnitaan lähimpään 0,1 grammaan, vatsalaukku ja suolisto poistetaan, munuaiset ja lisämunuaiset poistetaan ja punnitaan lähimpään 0,1 grammaan. Dissektiolla saadaan näkyviin virtsarakko, ja kohteena olevien uroksen lisäsukupuolirauhasten kudoksien leikkaaminen aloitetaan.

— Ventraalisen eturauhasen dissektiota varten virtsarakko erotetaan vatsalihaksesta leikkaamalla sidekudosta keskiviivaa pitkin. Siirrä virtsarakko paikaltaan kohti rakkularauhasia, jolloin esiin saadaan ventraalisen eturauhasen vasen ja oikea lohko (jonka päällä on rasvakerros). Puhdista varovaisesti ventraalisen eturauhasen oikean ja vasemman lohkon rasvakerros. Siirrä varovaisesti ventraalisen eturauhasen oikea lohko virtaputkesta ja leikkaa se irti virtsaputkesta. Pidä edelleen kiinni ventraalisen eturauhasen oikeasta lohkosta ja siirrä varovaisesti ventraalisen eturauhasen vasen lohko erilleen virtsaputkesta ja leikkaa se irti; punnitse lähimpään 0,1 milligrammaan ja kirjaa paino.

— Rakkularauhasten ja eturauhasen etuosan dissektiota varten siirrä virtsarakkoa kaudaaliseen suuntaan, jolloin saadaan esille siemenjohdin ja rakkularauhasten oikea ja vasen lohko sekä eturauhasen etuosa. Estä nesteen vuotaminen puristamalla hemostaattia rakkularauhasten ja eturauhasen etuosan tyvessä, jossa siemenjohdin liittyy virtsaputkeen. Leikkaa huolellisesti rakkularauhaset ja eturauhasen etuosa, jossa hemostaatti on paikallaan, poista rasva ja sivuelimet, sijoita taaratulle mittausastialle, poista hemostaatti, mittaa lähimpään 0,1 milligrammaan ja kirjaa paino.

— Peräaukon kohottajalihaksen ja värvelihaksen dissektiota varten peniksen lihakset ja tyvi ovat näkyvissä. Peräaukon kohottajalihakset ovat paksusuolen ympärillä ja etummainen peräaukon kohottajalihas ja värvelihas ovat kiinni peniksen paisuvaisissa. Perianaalisen alueen nahka ja sivuelimet poistetaan peniksen tyvestä peräaukon etummaiseen päähän saakka. Peräaukon kohottajalihakset irrotetaan vähitellen peniksen paisuvaisesta ja kudoksista. Paksusuoli leikataan kahtia ja peräaukon kohottajalihas ja värvelihas voidaan irrottaa leikkaamalla ja poistaa. Peräaukon kohottajalihas ja värvelihas puhdistetaan rasvasta ja sivuelimistä ja punnitaan lähimpään 0,1 milligrammaan, ja paino kirjataan.

— Kun peräaukon kohottajalihas ja värvelihas on poistettu, pyöreät Cowperin tai bulbouretaaliset rauhaset ovat näkyvissä peniksen paisuvaisen juuressa ja hieman sen dorsaalisella puolella. Tarvitaan huolellista dissektiota, jotta vältetään tekemästä viiltoa ohueen kalvoon, jolloin vältetään nesteen vuotaminen ulos. Punnitse Cowperin tai bulbouretaaliset rauhaset lähimpään 0,1 milligrammaan ja kirjaa paino.

— Lisäksi, jos jostain rauhasesta valuu nestettä ruumiinavauksen ja dissektion aikana, tämä olisi kirjattava.

55. Jos kunkin kemikaalin arviointiin tarvitaan niin monen eläimen ruumiinavausta, että se ei ole yhdelle päivälle kohtuullista, aloituspäivä voidaan porrastaa kahteen peräkkäiseen päivään, jolloin ruumiinavaus ja siihen liittyvä työ porrastetaan kahdelle päivälle. Jos työ porrastetaan tällä tavoin, kustakin koeryhmästä olisi käytettävä päivässä puolet eläimistä.

56. Ruhot olisi hävitettävä asianmukaisella tavalla ruumiinavauksen jälkeen.

TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Tiedot

57. Tiedot olisi ilmoitettava erikseen (eli ruumiinpaino, lisäsukupuolirauhasten kudokset, vapaaehtoiset mittaukset ja muut reaktiot ja havainnot) ja kustakin eläinryhmästä (keskiarvot ja keskihajonnat kaikista tehdyistä mittauksista). Tiedoista olisi esitettävä yhteenveto taulukkomuodossa. Tiedoista olisi käytävä ilmi eläinten lukumäärä testin alussa, testin aikana kuolleena löytyneiden tai sellaisten eläinten lukumäärä, joilla ilmenee myrkyllisyysvaikutuksia, kuvaus havaituista myrkyllisyysvaikutuksista, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste.

58. Loppuraporttiin sisältyy:

Testauslaitos

— laitoksen nimi, sijainti

— tutkimusjohtaja ja muu henkilöstö ja heidän tutkimusta koskevat vastuualueensa

— päivämäärät, milloin tutkimus alkoi ja päättyi, eli ensimmäinen päivä, kun testikemikaalia annettiin, ja viimeinen päivä, kun tehtiin ruumiinavaus.

Testikemikaali

— lähde, erän/annoksen numero, tunnistetiedot, puhtaus, toimittajan täydellinen osoite ja testikemikaalin (testikemikaalien) kuvaus

— fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet

— varastointiolosuhteet ja laimennoksien valmistuksen menettely ja valmistustiheys

— stabiliteetista tuotetut kaikki tiedot

— annosteluliuoksiin/suspensioihin liittyvät kaikki analyysit.

Kantaja-aine

— kantaja-aineen kuvaus (laatu, toimittaja ja eränumero)

— perustelu kantaja-aineen valinnalle (jos muu kuin vesi).

Koe-eläimet ja eläinten hoitoa koskevat menetelmät

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen valinnalle

— eläinten alkuperä tai toimittaja mukaan lukien täydellinen osoite

— toimitettujen eläinten lukumäärä ja ikä

— häkkiolosuhteet (esim. lämpötila ja valaistus)

— ravinto (nimi, tyyppi, toimittaja, eränumero, sisältö ja, jos tiedossa, fytoestrogeenin tasot)

— alustan materiaali (nimi, tyyppi, toimittaja, sisällys)

— häkkiolosuhteet ja eläinten lukumäärä häkkiä kohti.

Testiolosuhteet

— ikä kastrointihetkellä ja kastraation jälkeinen totutusvaihe

— kunkin eläimen paino testin alussa (lähimpään 0,1 milligrammaan)

— satunnaisotos ja tiedot kantaja-ainetta, vertailu-annosta ja testikemikaalia saaviin ryhmiin sekä häkkeihin jakamisesta

— kunkin ryhmän ruumiinpainon keskiarvo ja keskihajonta kunakin punnituspäivänä koko tutkimuksen ajan

— annoksen valintaperusteet

— tiedot testikemikaalin annostuksesta ja altistusreitin valintaa koskevat valintaperusteet

— jos tehdään antiadrogeenisuusvaikutuksia koskeva testi, TP-käsittely (annos ja tilavuus)

— altistus testikemikaalilla (annos ja tilavuus)

— annosteluajankohta

— ruumiinavausmenetelmät, mukaan lukien veren valuttaminen pois ja mahdollisesti käytetty anestesia

— jos seerumianalyyseja tehdään, toimitetaan menetelmää koskevat tiedot. Esimerkiksi, jos käytetään radioimmunoanalyysia, olisi kirjattava radioimmunoanalyysia koskeva menettely, sen välineistön alkuperä ja voimassaoloajat, menetelmä tuikelaskennalle ja vakiointi.

Tulokset

— päivittäiset havainnot kustakin eläimestä annosteluaikana, mukaan lukien:

— ruumiinpaino (lähimpään 0,1 milligrammaan)

— kliiniset oireet (jos niitä esiintyy)

— ravinnonkulutusta koskevat kaikki mittaukset tai muistiinpanot

— ruumiinavauksen havainnot kustakin eläimestä, mukaan lukien:

— ruumiinavauksen ajankohta

— eläimen koeryhmä

— eläimen tunniste

— kudoksen leikkaaja

— ajankohta, jolloin ruumiinavaus ja dissektio suoritetaan

— eläimen ikä

— lopullinen ruumiinpaino ruumiinavauksessa ja sen tilastollisesti merkittävät laskut ja nousut

— järjestys, jossa eläimeltä valutetaan veri pois ja dissektio suoritetaan ruumiinavauksessa

— viiden androgeeniriippuvaisen kohdekudoksen painot:

— ventraalinen eturauhanen (lähimpään 0,1 milligrammaan)

— rakkularauhaset ja eturauhasen etuosa sekä niiden nesteet (pareittain, lähimpään 0,1 milligrammaan)

— peräaukon kohottajalihaksen ja värvelihaksen yhdistelmä (lähimpään 0,1 milligrammaan)

— Cowperin rauhaset (käsittelemätön paino, pareittain, lähimpään 0,1 milligrammaan)

— terska (käsittelemätön paino, lähimpään 0,1 milligrammaan)

— Vaihtoehtoisten kudosten painot, jos otetaan:

— maksa (lähimpään 0,1 milligrammaan)

— munuaiset (pareittain, lähimpään 0,1 milligrammaan)

— lisämunuaiset (pareittain, lähimpään 0,1 milligrammaan)

— yleiset huomautukset ja kommentit

— seerumin hormonien analyysi, jos suoritetaan

— seerumin LH-hormoni (vaihtoehtoinen — ng millilitrassa seerumia), ja

— seerumin T-hormoni (vaihtoehtoinen — ng millilitrassa seerumia)

— yleiset huomautukset ja kommentit.

Tietojen tiivistäminen

Tulokset esitetään taulukkomuodossa, josta ilmenevät kunkin ryhmän otoskoko, keskiarvo arvosta, ja keskiarvon keskivirhe tai keskihajonta. Taulukkoihin pitäisi sisältyä ruumiinavauksen ruumiinpainot, ruumiinpainon muutokset annostuksen alusta ruumiinavaukseen, lisäsukupuolirauhasten kohdekudosten paino ja valinnaisten elinten painot.

Tulosten pohdinta

Tulosten analysointi

59. Ruumiinavauksen ruumiinpaino ja elinten painot olisi analysoitava tilastollisesti varianssien homogeenisuuden kaltaisten ominaisuuksien osalta tarvittaessa asianmukaisten tietojen muunnoksien avulla. Testiryhmiä olisi verrattava kontrolliryhmiin käyttäen varianssianalyysin kaltaista tekniikkaa, jonka jälkeen suoritetaan vertailevia arvioita (esim. Dunnettin yksitahoinen testi) ja tilastollisista eroa koskevaa kriteeriä, esim. $p \leq 0,05$. Ne ryhmät, joilla on tilastollista merkittävyyttä, olisi täsmennettävä. Kuitenkin 'elinten suhteellisia' painoja pitäisi välttää, koska näiden tietojen käsittelyn taustalla on virheellisiä tilastollisia oletuksia.

60. Androgeenivaikutuksia omaavien agonistien osalta kontrolliryhmänä pitäisi olla pelkästään kantaja-ainetta saanut testiryhmä. Testikemikaalin vaikutustavan ominaispiirteet voivat johtaa erilaisiin suhteellisiin vasteisiin kudoksissa. Esimerkiksi trenbolonilla, jolla on 5-alfa-reduktaasin suhteen resistenssi, on vahvempia vaikutuksia peräaukon kohottajalihakseen ja värvelihakseen sekä terskaan kuin TP:llä. Tilastollisesti merkittävää lisäystä ($p \leq 0,05$) kahden tai useamman androgeeniriippuvaisen kohdekudoksen painoissa (ventraalinen eturauhanen, rakkularauhanen, peräaukon kohottajalihas ja värvelihas, Cowperin rauhaset ja terska) olisi pidettävä androgeenivaikutuksen omaavan agonistin osalta positiivisena tuloksena, ja kaikissa kohdekudoksissa pitäisi voida havaita, että kasvu on lisääntynyt jonkin verran. Yhdistetty arviointi kaikista lisäsukupuolirauhasten kudosten reaktioista voidaan toteuttaa käyttäen asianmukaista monimuuttuja-analyysia. Tällä voidaan parantaa analyysia erityisesti tapauksissa, missä ainoastaan yksi kudos tuottaa tilastollisesti merkittävän vasteen.

61. Androgeenivaikutuksia omaavien agonistien osalta kontrolliryhmänä pitäisi olla koeryhmä, joka sai vertailuun käytettyä androgeenia (ainoastaan testosteroni-propionaattia). Testikemikaalin vaikutustavan ominaispiirteet voivat johtaa erilaisiin suhteellisiin reaktioihin kudoksissa. Esimerkiksi 5-alfa-reduktaasin estäjillä, kuten finasterdillä on tuntuvampia vaikutuksia ventraaliseen eturauhaseen kuin muihin kudoksiin, verrattuna voimakkaisiin AR-antagonisteihin, kuten flutamidiin. Tilastollisesti merkittävää vähennystä ($p \leq 0,05$) kahden tai useamman androgeeniriippuvaisen kohdekudoksen painossa (ventraalinen eturauhanen, rakkularauhanen, peräaukon kohottajalihas ja värvelihas, Cowperin rauhaset ja terska) verrattuna käsittelyyn pelkästään TP:llä olisi pidettävä androgeenivaikutuksen omaavan agonistin osalta positiivisena tuloksena, ja kaikissa kohdekudoksissa pitäisi voida havaita, että kasvu on vähentynyt jonkin verran. Yhdistetty arviointi kaikista lisäsukupuolirauhasten kudosten reaktioista voidaan toteuttaa käyttäen asianmukaista monimuuttuja-analyysia. Tällä voidaan parantaa analyysia erityisesti tapauksissa, missä ainoastaan yksi kudos tuottaa tilastollisesti merkittävän vasteen.

62. Tiedot esitetään taulukkomuodossa, johon sisältyvät kunkin ryhmän keskiarvo ja keskiarvon keskivirhe (keskihajonta on myös hyväksyttävä) sekä otoskoko. Lisäksi olisi esitettävä yksittäisiä taulukkotietoja. Kontrollitietojen yksittäisiä arvoja, keskiarvoa, keskivirhettä (keskihajonta) ja variaatiokertoimen arvoja olisi tarkasteltava, jotta määritetään, täyttävätkö ne hyväksyttävät johdonmukaisuutta koskevat kriteerit todennäköisten aikaisempien arvojen kanssa. Variaatiokertoimilla, jotka ylittävät taulukossa 1 luetellut variaatiokertoimen arvot (ks. 25 ja 26 kohta) kunkin elimen painon osalta, pitäisi määritellä, sisältyykö tietojen tallentamiseen tai kirjaamiseen virheitä tai sitä, eikö laboratorio vielä hallitse androgeeniriippuvaisten kudosten tarkkaa dissektiota, jolloin jatkokoulutus/harjoittelu on perusteltua. Yleensä variaatiokertoimet (keskihajonta jaettuna keskimääräisellä elimen painolla) ovat

toistettavissa laboratoriosta toiseen ja tutkimuksesta toiseen. Esitettyihin tietoihin pitäisi sisältyä ainakin ventraalinen eturauhanen, peräaukon kohottajalihas ja värvelihaksen rakkularauhanen, Cowperin rauhaset, terska, maksa ja ruumiinpainot sekä ruumiinpainon muutokset annostuksen alkamisesta ruumiinavaukseen. Tiedot voidaan esittää myös sen jälkeen, kun ruumiinpainoa on mukautettu kovarianssin perusteella, mutta tämän ei pitäisi korvata alkuperäisten tietojen esittämistä. Lisäksi, jos esinahkan eroamista ei ole tapahtunut missään ryhmässä, tämä olisi kirjattava ja sitä olisi vertailtava tilastollisesti kontrolliryhmään Fisherin tarkkaa testiä käyttämällä.

63. Kun tietokoneelle syötettyjä tietoja tarkistetaan alkuperäisten tietolomakkeiden perusteella tietojen täsmällisyyden osalta, niiden elinten painon arvot, jotka eivät ole biologisesti vakuuttavia tai jotka vaihtelevat kyseisestä koeryhmästä enemmän kuin kolmen keskihajonnan osalta, merkitsee, että niitä on tutkittava huolellisesti ja ne on ehkä hylättävä, koska ne ovat todennäköisesti merkintävirheitä.

64. Tutkimustulosten vertailu OECD:n variaatiokertoimen arvojen (taulukko 1) kanssa on usein tärkeä vaihe, kun tutkimustulosten pätevyyttä tulkitaan. Kantaja-ainetta saaneen kontrolliryhmän aikaisemmat tiedot olisi säilytettävä laboratoriossa. Positiivisten referenssikemikaalien, kuten TP:n ja FT:n reaktioita koskevat aikaisemmat tiedot olisi myös säilytettävä laboratoriossa. Laboratoriot voivat myös ajoittain testata tunnettujen heikkojen androgeenivaikutuksen omaavien agonistien ja antagonistien vastetta ja säilyttää nämä tiedot. Näitä tietoja voidaan verrata saatavilla oleviin OECD:n tietoihin. Näin varmistetaan, että laboratorion menetelmät tuottavat riittävää tilastollista tarkkuutta ja voimaa.

Lisäys 1

MÄÄRITELMÄT:

Androgeenivaikutus on käsite, jolla kuvataan positiivista vaikutusta androgeeniriippuvaisten kudosten kasvuun.

Antiandrogeenivaikutus on kemikaalin kyky estää TP:n vaikutus nisäkkään elimistössä.

Kemikaalilla tarkoitetaan ainetta tai aineiden seosta.

Syntymäaika on syntymän jälkeinen päivä 0.

Annos on annostellun testikemikaalin määrä. Hershbergerin biotestissä annos ilmaistaan testikemikaalin painona koe-eläimen ruumiinpainon yksikköä kohden vuorokaudessa (esim. milligramma testikemikaalia painokiloa kohti vuorokaudessa).

Annostus on yleinen käsite, johon sisältyy annos, annostiheys ja annostuksen kesto.

Kuolemaisillaan oleva on käsite, jolla kuvataan kuolevaa eläintä eli kuoleman partaalla olevaa eläintä.

Syntymän jälkeinen päivä X on eläimen syntymästä saakka laskettava elinpäivä X.

Herkkyys tarkoittaa testimenetelmän kykyä tunnistaa oikein kemikaalit, joilla on ominaisuudet, mitä kokeilla testataan.

Spesifiys tarkoittaa testimenetelmän kykyä tunnistaa oikein kemikaalit, joilla ei ole ominaisuutta, mitä kokeilla testataan.

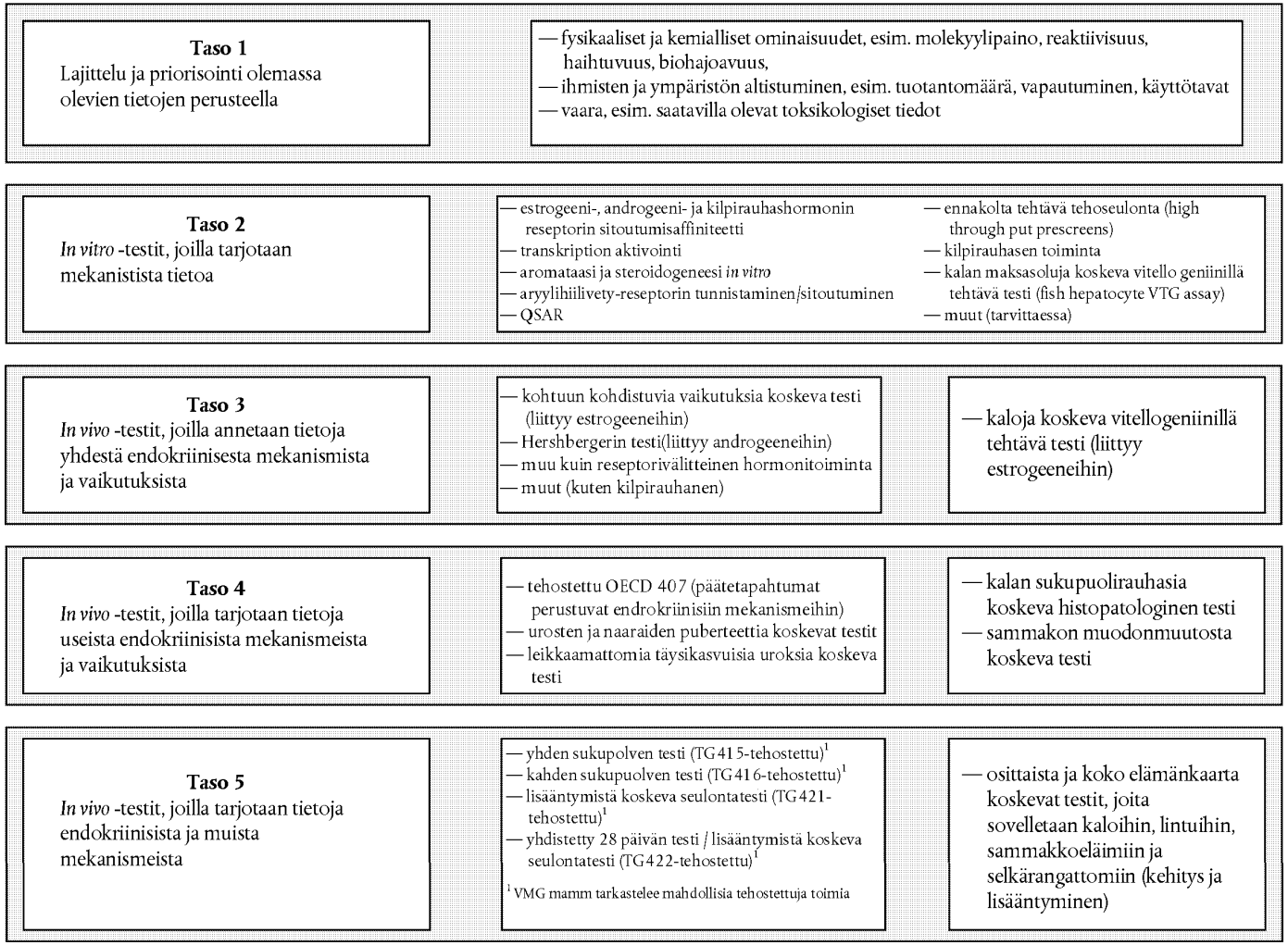
Testikemikaali on mitä tahansa aine tai seos, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää.

Validointi on tieteellinen prosessi, joka on suunniteltu kuvaamaan toiminnallisia vaatimuksia ja testimenetelmän rajoja sekä osoittamaan sen luotettavuus ja asiaankuuluvuus tiettyä tarkoitusta varten.

Lisäys 2

Huom.: Testiohjeita koskevan ohjelman sihteeristön valmistelema asiakirja hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevan työryhmän (EDTA) 6. kokouksessa tehdyn sopimuksen pohjalta

OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevat käsitteelliset puitteet



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

KÄSITEKEHYKSEEN LIITTYVÄT HUOMAUTUKSET:

Huomautus 1: Siirtyminen ja poistuminen on mahdollista kaikilla tasoilla ja riippuu olemassa olevan tietotarpeen luonteesta vaaran ja riskin arvioinnin suhteen.

Huomautus 2: Tasolla 5 ekotoksilogiaan olisi sisällyttävä päätetapahtumat, jotka osoittavat haittavaikutuksia koskevat mekanismit ja populaatiolle mahdollisesti aiheutuvat vahingot.

Huomautus 3: Jos multimodaalimallilla katetaan useita yksittäisiä päätetapahtumia koskevia testejä, tämä malli korvaa tällaiset yksittäisiä päätetapahtumia koskevat testit.

Huomautus 4: Kunkin kemikaalin arvioinnin olisi oltava tapauskohtainen, ja siinä otetaan huomioon kaikki saatavilla oleva tieto käsitekehyksen tasojen tarkoituksen huomioon ottaen.

Huomautus 5: Kehystä ei olisi pidettävä sellaisena, että se kattaa tällä hetkellä kaiken. Siihen sisältyy tasoilla 3, 4 ja 5 testejä, jotka ovat käytössä tai joiden validointi on meneillään. Testit, joiden validointi on kesken, sisällytetään väliaikaisesti. Kun ne on kehitetty ja validoitu, ne lisätään muodollisesti kehykseen.

Huomautus 6: Tasoa 5 ei olisi pidettävä sellaisena, että siihen sisältyy pelkästään lopullisia testejä. Kyseiseen tasoon sisältyvien testien katsotaan edistävän yleistä vaarojen ja riskien arviointia.

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

(4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265–1269.

(8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671–8.

(9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413–422.

(10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306–1314.

(11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38–44.

(12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113–119.

(13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175–180.

(14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151–220.

(16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, s 38.

(17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265–1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html

(23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

(26) Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2010/63/EU, annettu 22 päivänä syyskuuta 2010, tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta (EUVL L 276, 20.10.2010, s. 33).

(27) Tämän liitteen seuraavat luvut:

B.1 a, Akuutti oraalinen toksisuus — vakioannosmenetelmä

B.1 b, Akuutti oraalinen toksisuus — akuutin toksisuusluokan menetelmä

B.56. PIDENNETTY YHDEN SUKUPOLVEN LISÄÄNTYMISTOKSISUUTTA KOSKEVA TUTKIMUS

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 443 (2012). Se perustuu International Life Science Institute -organisaation (ILSI) ja Health and Environmental Sciences Institute -organisaation (HESI) maatalouden kemikaaliturvallisuudenarvioinnista (ACSA) vastaavan teknisen komitean ehdotukseen F_1-kehitysvaihetta koskevasta pidennetystä yhden sukupolven lisääntymistutkimuksesta, siten kuin se julkaistiin lähteessä Cooper et al., 2006 (1). Tutkimuksen suunnittelua varten on tehty useita parannuksia ja selvennyksiä. Niillä tarjotaan joustavuutta ja korostetaan, että tutkimus on tärkeää aloittaa eläviä eläimiä koskevista tiedoista ja että samalla käytetään koehavaintoja testauksen ohjaamiseksi ja suunnittelemiseksi. Tässä testimenetelmässä annetaan yksityiskohtainen kuvaus pidennetyn yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevan tutkimuksen suorittamisesta. Tässä testimenetelmässä kuvataan F_1-sukupolven eläinten kolmea kohorttia:

Kohortti 1: arvioidaan lisääntymiseen/kehitykseen liittyviä päätetapahtumia; tätä kohorttia voidaan laajentaa sisällyttämällä siihen F_2-sukupolvi.

Kohortti 2: arvioidaan kemikaalille altistumisen mahdollista vaikutusta kehittyvään hermostoon.

Kohortti 3: arvioidaan kemikaalille altistumisen mahdollista vaikutusta kehittyvään immuunijärjestelmään.

2. Päätöksissä siitä, arvioidaanko toista sukupolvea ja jätetäänkö hermostonkehityksen myrkyllisyysvaikutuksia koskeva kohortti ja/tai immuunijärjestelmän kehityksen myrkyllisyysvaikutuksia koskeva kohortti arvioinnin ulkopuolelle, olisi otettava huomioon arvioitavasta kemikaalista olemassa olevat tiedot sekä eri sääntelyviranomaisten tarpeet. Testimenettelyn tarkoituksena on antaa tietoja siitä, miten tutkimus voidaan suorittaa ja käsitellä sitä, miten kutakin kohorttia olisi arvioitava.

3. OECD:n ohjeasiakirjassa 117 (39) kuvataan menettelyä päätökselle sisäisistä ominaisuuksien mittaamiseen liittyvistä tekijöistä toisen sukupolven tuottamiseksi niitä sääntelyviranomaisia varten, jotka käyttävät sisäisiä käynnistäviä tekijöitä (internal triggers).

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA TAVOITTEET

4. Pidennetyn yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevan tutkimuksen päätavoite on arvioida tiettyjä kehitysvaiheita, jotka eivät kuulu muiden toksisuustutkimusten piiriin ja testata vaikutuksia, joita voi esiintyä syntymää edeltävän ja sen jälkeisen kemikaalille altistumisen seurauksena. Kun kyseessä ovat lisääntymistä koskevat päätetapahtumat, tarkoituksena on käyttää ensimmäisenä toimenpiteenä tietoja toistuvan annostelun tutkimuksista (mukaan lukien lisääntymistoksisuutta koskevat seulontatutkimukset, kuten OECD:n testiohje 422 (32)), tai hormonaalisia haitta-aineita koskevista lyhyen aikavälin seulontatesteistä (esim. kohtuun kohdistuvia vaikutuksia koskeva testi, testimenetelmä B.54 (36) taikka Hershbergerin testi, testimenetelmä B.55 (37)), jos niitä on saatavilla, havaitsemaan urosten ja naarasten lisääntymiselimiin aiheutuvia vaikutuksia. Tähän voi sisältyä urosten osalta spermatogeneesi (kivesten histopatologia) ja naaraiden osalta kiimasykli, munarakkuloiden laskeminen/oosyyttien kypsyminen ja munasarjojen eheys (histopatologia). Laajennettu yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskeva tutkimus on testi lisääntymistä koskeville päätetapahtumille, ja siihen tarvitaan urosten ja naarasten välistä vuorovaikutusta, kantavia naaraita, naaraita, joilla on poikaset ja F_1-sukupolvea sukukypsyysiän jälkeen saakka (ks. OECD:n ohjeasiakirja 151, joka tukee tätä testimenetelmää (40)).

5. Tämä testimenetelmä on suunniteltu niin, että sillä tarjotaan arviointi syntymää edeltävän ja sen jälkeisen kemikaalille altistumisen vaikutuksesta kehitykseen sekä perusteellinen arviointi tiineenä olevien ja imettävien naaraiden sekä nuorten ja täysikasvuisten poikasten systeemisestä toksisuudesta. Keskeisten kehitykseen liittyvien päätetapahtumien — kuten poikasten elinkyky, vastasyntyneen terveys, kehityksen tila syntymähetkellä sekä fyysinen ja toiminnallinen kehitys täysikasvuiseksi saakka — yksityiskohtaisen tutkimuksen tarkoituksena on määrittää poikasten erityiset kohde-elimet. Lisäksi tutkimus tarjoaa ja/tai vahvistaa tietoja testikemikaalin vaikutuksesta täysikasvuisen uroksen ja naaraan lisääntymiselimien eheyteen ja toimintaan. Erityisesti, mutta ei yksinomaan, tarkastellaan seuraavia parametreja: sukupuolirauhasten toiminta, kiimasykli, lisäkivesten siemennesteen siittiöiden kypsyminen, pariutumiskäyttäytyminen, hedelmöityminen, tiineys, synnytys ja imetys. Lisäksi hermostonkehityksen myrkyllisyysvaikutuksia ja immuunijärjestelmän kehityksen myrkyllisyysvaikutuksia koskevista arvioinneista saadut tiedot kuvaavat mahdollisia vaikutuksia kyseisissä elimissä ja järjestelmissä. Näistä testeistä saatujen tietojen avulla pitäisi voida olla mahdollista määritellä taso, joka ei aiheuta havaittavaa haittavaikutusta (NOAEL), taikka alhaisin havaittavan haittavaikutuksen aiheuttava taso (LOAEL), ja/tai vertailukohtana olevat annokset useita päätetapahtumia varten ja/tai joita käytetään kuvaamaan vaikutuksia, jotka on havaittu aikaisemmissa toistuvilla annoksilla tehdyissä tutkimuksissa, ja/tai jotka ovat ohjeena myöhemmin suoritettaville testeille.

6. Menettelystä esitetään kaavio kuvassa 1. Testattavaa kemikaalia annetaan jatkuvasti porrastettuina annoksina usealle sukukypsistä uroksista ja naaraista koostuvalle ryhmälle. Tälle poikasia saaneelle sukupolvelle (P-sukupolvi) annetaan annos määritetylle pariutumista edeltävälle ajanjaksolle (joka valitaan testikemikaalista saatavilla olevan tiedon perusteella, mutta joka on vähintään kaksi viikkoa) ja kahden viikon pariutumisjaksolle. P-urokset saavat kemikaalia ainakin F_1-sukupolven vieroitukseen saakka. Niiden pitäisi saada kemikaalia vähintään 10 viikon ajan. Ne voivat saada sitä pidempään, jos lisääntymiseen aiheutuvia vaikutuksia ei tarvitse selvittää. P-naaraiden käsittelyä jatketaan tiineyden ja imetyksen ajan, kunnes poikueiden vieroittaminen päättyy (eli käsittely kestää 8–10 viikkoa). F_1-poikaset käsitellään edelleen testikemikaalilla vieroitusiästä täysikasvuiseksi saakka.Jos toista sukupolvea arvioidaan (ks. OECD:n ohjeasiakirja 117 (39)), F_1-poikasten käsittelyä jatketaan F_2-sukupolven vieroitukseen saakka tai tutkimuksen päättämiseen asti.

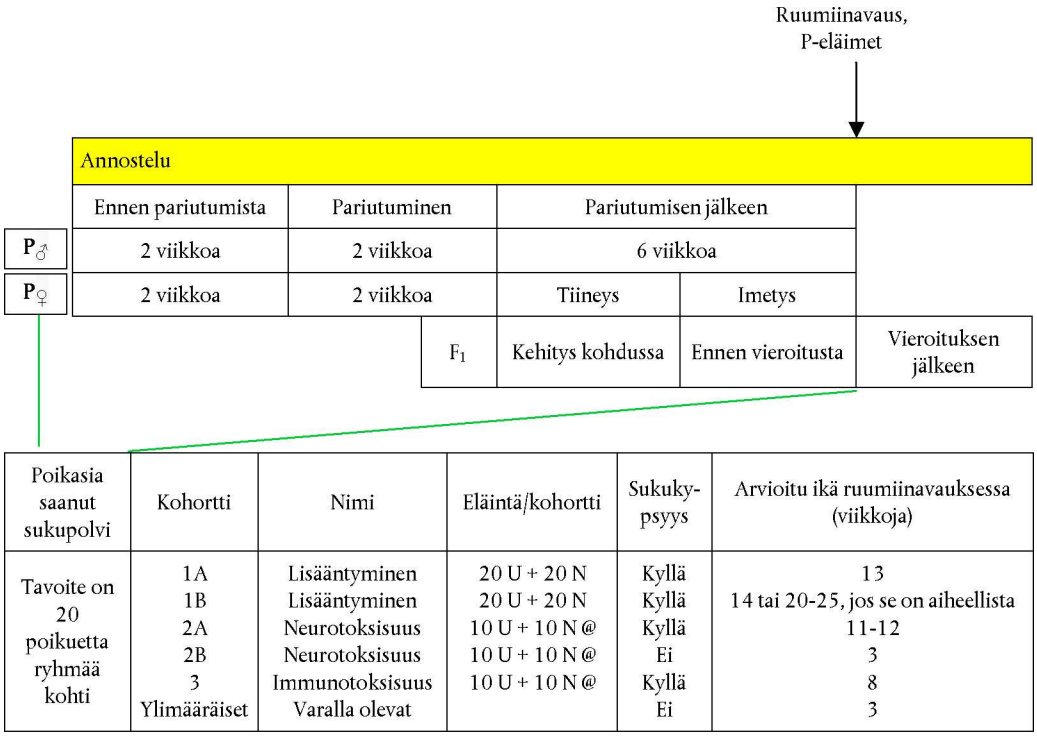
7. Kaikista eläimistä tehdään kliiniset havainnot ja patologiset tutkimukset, joissa tarkastellaan myrkytysoireita. Erityistä huomiota kiinnitetään urosten ja naaraiden lisääntymiselinten eheyteen ja toimintaan sekä poikasten terveyteen, kasvuun, kehitykseen ja toimintaan. Valitut poikaset osoitetaan vieroituksen yhteydessä erityisiin alaryhmiin (kohortit 1–3, ks. 33 ja 34 kohta sekä kuva 1) lisätutkimuksia varten. Näihin sisältyvät sukukypsyys, lisääntymiselinten eheys ja toiminta, neurologiset ja käyttäytymistä mittaavat päätetapahtumat sekä immuunijärjestelmän toiminta.

8. Tutkimuksen toteuttamisessa olisi noudatettava periaatteita ja näkökohtia, jotka esitetään pääpiirteittäin OECD:n ohjeasiakirjassa 19 kliinisten oireiden tunnustamisesta, arvioimisesta ja soveltamisesta inhimillisinä toimenpiteinä turvallisuusarvioinneissa käytettäviin eläimiin (34).

9. Kun käytössä on riittävä määrä tutkimuksia tämän uuden tutkimussuunnitelman vaikutuksen arvioimiseksi, testimenetelmää tarkastellaan uudelleen ja tarvittaessa tarkistetaan saadun kokemuksen perusteella.

Kuva 1

Järjestelmä pidennetylle yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevalle tutkimukselle



Poikasia saanut sukupolvi	Kohortti	Nimi	Eläintä/kohortti	Sukukypsyys	Arvioitu ikä ruumiinavauksessa (viikkoja)
Tavoite on 20 poikuetta ryhmää kohti	1A	Lisääntyminen	20 U + 20 N	Kyllä	13
	1B	Lisääntyminen	20 U + 20 N	Kyllä	14 tai 20-25, jos se on aiheellista
	2A	Neurotoksisuus	10 U + 10 N @	Kyllä	11-12
	2B	Neurotoksisuus	10 U + 10 N @	Ei	3
	3	Immunotoksisuus	10 U + 10 N @	Kyllä	8
	Ylimääräiset	Varalla olevat		Ei	3

@ yksi poikuetta kohden ja edustaja yhteensä 20 poikueesta jos mahdollista

MENETELMÄN KUVAUS/TESTIN VALMISTELU

Eläimet

Eläinlajin ja kannan valinta

10. Lajien valintaa lisääntymistoksisuutta koskevaan tutkimukseen olisi harkittava tarkasti kaiken saatavilla olevan tiedon perusteella. Rotta on yleensä suositeltavin laji, koska taustatietoja on paljon ja niitä voidaan vertailla yleisiin toksisuustesteihin. Tässä testimenetelmässä annetuissa kriteereissä ja suosituksissa viitataan rottaan. Jos toista lajia käytetään, tämä on perusteltava, ja protokollaan on tehtävä asianmukaiset muutokset. Kantoja, joiden hedelmällisyys on alhainen tai joilla tiedetään esiintyvän korkea määrä spontaaneja kehityshäiriöitä, ei pitäisi käyttää.

Ikää, ruumiinpainoa ja ryhmiin sisällyttämistä koskevat kriteerit

11. Olisi käytettävä terveitä poikasia saaneen sukupolven eläimiä, joita ei ole käytetty aiempiin kokeisiin. Sekä uroksia että naaraita tutkitaan, ja naaraiden on oltava synnyttämättömiä, eivätkä ne saa olla tiineenä. P-eläinten olisi oltava sukukypsiä ja samanpainoisia (sukupuolen mukaan) annostuksen alkuvaiheessa, samanikäisiä (noin 90 päivää) pariutumisvaiheessa, ja niiden on kuuluttava tutkittavaan lajiin ja kantaan. Eläimiä olisi totutettava olosuhteisiin ainakin viiden päivän ajan vastaanottamisen jälkeen. Eläimet jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmiin niin, että ryhmien välinen ruumiinpainon keskiarvo on vertailukelpoinen (eli se on ± 20 % keskiarvosta).

Koe-eläinten häkit ja ruokinta

12. Koe-eläinhuoneen lämpötilan pitäisi olla 22 °C (± 3 °C). Suhteellisen kosteuden pitäisi olla 30–70 %, ja ihanteellinen väli on 50–60 %. Keinovaloa olisi käytettävä jaksossa 12 tuntia valoa, 12 tuntia pimeää. Normaalia

laboratorioruokavaliota voidaan käyttää, ja juomaveden määrää ei saa rajoittaa. Olisi kiinnitettävä erityistä huolta siihen, kuinka paljon ravintoon sisältyy fytoestrogeenia, koska korkea määrä fytoestrogeenia ravinnossa voi vaikuttaa tiettyihin kehitykseen liittyviin päätetapahtumiin. Vakiomuotoista ruokavaliota, jonka sisältö kirjataan ja jossa estrogeenisia kemikaaleja on vähennetty, suositellaan (2)(30). Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa sopiva sekoitus testikemikaalia, kun sitä annetaan tämän menettelyn mukaisesti. Testikemikaalin sisältö, homogeenisuus ja stabiliteetti ruokavaliossa olisi varmistettava. Rehuun ja juomaveteen mahdollisesti sisältyviä epäpuhtauksia olisi säännöllisesti analysoitava. Kunkin tutkimuksen aikana annetun ravintoerän edustavaa näytettä olisi säilytettävä asianmukaisissa oloissa (eli pakastettuna – 20 °C lämpötilassa) raportin valmistumiseen saakka, jos tulokset edellyttävät ruokavalion ainesosien tarkempaa analyysia.

13. Eläimet voidaan pitää häkeissä pienissä samaa sukupuolta ja samassa koeryhmässä olevien eläinten ryhmissä. Niitä voidaan joutua pitämään häkeissä yksittäin mahdollisten vaurioiden välttämiseksi (esim. urokset pariutumisjaksolla). Parituksen tulee tapahtua tarkoitukseen sopivissa häkeissä. Kun parituksen todetaan tapahtuneen, naaraat, joiden oletetaan olevan tiineinä, sijoitetaan erikseen synnytys- tai poikimishäkkiin, jossa niille annetaan asianmukaisia ja määriteltyjä pesäntekoaineita. Poikueet pidetään emojen kanssa vieroitukseen saakka. F_1-eläimet voidaan pitää häkeissä pienissä samaa sukupuolta ja samassa koeryhmässä olevien eläinten ryhmissä vieroituksesta lopettamiseen saakka. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin, jos tämä on tieteellisesti perusteltua. Valittuun alusmateriaalin pitäisi sisältyä mahdollisimman vähän fytoestrogeeneja.

Eläinten lukumäärä ja tunnistaminen

14. Yleensä kussakin koe- ja kontrolliryhmässä pitäisi olla niin paljon pariutuneita eläinpareja, että jokaiseen annosryhmään saadaan ainakin 20 tiinettä naarasta. Tavoitteena on tarpeeksi tiineystapauksia, jotta voidaan tehdä merkitsevä arvio kemikaalin vaikutuksesta P-sukupolven hedelmällisyyteen, tiineyteen ja emon käytökseen sekä F_1-sukupolven kasvuun ja kehitykseen hedelmöityksestä sukukypsyyteen saakka. Jos tutkimuksessa ei päästä tavoiteltuun tiineiden eläinten määrään, tämä ei välttämättä mitätöi tutkimusta, ja tätä on arvioitava tapauskohtaisesti ottaen huomioon testikemikaaliin liittyvän mahdollisen syy-yhteyden.

15. Kullekin P-eläimelle annetaan oma tunnistenumero ennen annostelun aloittamista. Jos aikaisempien laboratoriotietojen perusteella vaikuttaa siltä, että huomattavalla määrällä naaraista ei ole säännöllinen (neljän tai viiden päivän) kiimakierto, niin ennen käsittelyn aloittamista suositellaan kiimakierron arviointia. Vaihtoehtoisesti ryhmän kokoa voidaan lisätä, jotta varmistetaan, että ainakin 20 naaralla kussakin ryhmässä on säännöllinen (neljän tai viiden päivän) kiimakierto käsittelyn alussa. Kaikki F_1-poikaset tunnistetaan yksilöllisesti, kun vastasyntyneet tutkitaan ensimmäisen kerran syntymän jälkeisenä päivänä 0 tai 1. Kaikkien F_1-eläinten, ja tarvittaessa F_2-eläinten, alkuperäispoikue on merkittävä muistiin, ja tiedot olisi säilytettävä koko tutkimuksen ajan.

Testikemikaali

Testikemikaalista saatavilla olevat tiedot

16. Olemassa olevien tietojen tarkastelu on tärkeää, kun tehdään päätöksiä altistusreiteistä, kantaja-aineen valinnasta, eläinlajin valinnasta, annosten valinnasta ja mahdollisista muutoksista altisaikataulussa. Tästä syystä kaikki saatavilla olevat asianmukaiset tiedot testikemikaalista, eli fysikokemialliset, toksikokineettiset (mukaan lukien lajispesifinen metabolia) ja toksikodynaamiset ominaisuudet, rakenne-aktiivisuussuhteet, metaboliset prosessit *in vitro*, tulokset aikaisemmista toksisuustutkimuksista ja asiaankuuluvat tiedot rakenteeltaan vastaavista aineista olisi otettava huomioon pidennetyn yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevan tutkimuksen suunnittelussa. Alustavat tiedot absorptiosta, jakautumisesta, metaboloinnista ja erittymisestä sekä biokertyvyydestä voidaan saada kemiallisesta rakenteesta, fysikokemiallisista tiedoista, plasmaproteiinin sitoutumisen laajuudesta tai toksikokineettisistä tutkimuksista, ja toksisuustutkimuksista saadaan lisätietoja erityisesti haitattomasta vaikutustasosta, metaboliasta tai metabolian induktiosta.

Toksikokineettisten tietojen tarkastelu

17. Aikaisemmin suoritetuista raja-annostutkimuksista tai muista tutkimuksista saadut toksikokineettiset tiedot eivät ole välttämättömiä, mutta ne ovat erittäin hyödyllisiä tutkimuksen suunnittelun, annostasojen valinnan ja tuloksien tulkinnan suhteen. Erityisen hyödyllisiä ovat tiedot, joilla: 1) varmistetaan kehittyvien sikiöiden ja poikasten altistuminen testikemikaalille (tai asiaankuuluville metaboliiteille); 2) annetaan arvio sisäisestä dosimetriasta;

ja 3) arvioidaan kineettisten prosessien annoksesta riippuvan saturaation mahdollisuutta. Täydentäviä toksikokineettisiä tietoja, kuten metaboliittiprofiilit, pitoisuuteen liittyvät ajan funktiot, on myös tarkasteltava, jos niitä on saatavilla. Täydentävät toksikokineettiset tiedot voidaan kerätä myös varsinaisen tutkimuksen aikana, jos se ei häiritse varsinaisen tutkimuksen päätetapahtumien keräämistä ja tulkintaa.

Yleinen ohje on, että seuraava toksikokineettisten tietojen kokonaisuus olisi hyödyllinen pidennetyn yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevan tutkimuksen suunnittelulle:

— myöhäinen tiineysaika (esim. tiineyspäivä 20): emon veri ja sikiöveri

— imetyksen puolessa välissä (syntymän jälkeinen päivä 10): emon veri, poikasen veri ja/tai maito

— varhaisessa vaiheessa vieroituksen jälkeen (esim. syntymän jälkeinen päivä 28): vastavieroitetun verinäytteet.

Tiettyjen analyyttien (esim. alkuperäinen kemikaali ja/tai metaboliitit) määrittelyssä ja näytteenotto-ohjelmassa olisi sovellettava joustavuutta. Esimerkiksi kerättävien näytteiden määrä ja keräämisen ajoitus tiettynä näytteenottopäivänä riippuu muiden kuin tiineinä olevien eläinten altistusreitistä ja siitä, onko niiden toksikokineettisistä ominaisuuksista aiempia tietoja. Tutkimuksissa, joissa testiaine annetaan ravintoon sekoitettuna, riittää näytteenotto yhtenä johdonmukaisena ajankohtana kunakin näinä päivinä. Annostelu letkuruokinnalla voi vaatia täydentäviä näytteenottoaikoja, jotta saadaan parempi arvio erilaisista sisäisistä annoksista. Minään näytteenottopäivänä ei ole kuitenkaan tarpeen tehdä täydellistä tutkimusta pitoisuuteen liittyvästä aktiviteetista. Veri voidaan tarvittaessa eritellä sukupuolittain poikueiden sisällä sikiön ja vastasyntyneen analyyseja varten.

Annostelureitti

18. Reitin valinnassa olisi otettava huomioon ihmisen altistumiselle tarkoituksenmukaisin reitti (reitit). Vaikka testiprotokolla on suunniteltu testikemikaalin antamiseen ravinnon välityksellä, sitä voidaan muokata niin, että voidaan käyttää muuta antotapaa (juomaveden välityksellä, letkulla, inhalaatiolla, ihon kautta) kemikaalin ominaisuuksista sekä tarvittavista tiedoista riippuen.

Kantaja-aineen valinta

19. Testikemikaali liuotetaan tai suspensoidaan tarvittaessa sopivaan kantaja-aineeseen. Suositusten mukaan ensin on harkittava vesipohjaisen liuoksen/suspension käyttöä, sitten öljypohjaista (esimerkiksi maissiöljy) liuosta/suspensiota, kun tämä on mahdollista. Jos kantaja-aine ei ole vesi, sen toksiset ominaisuudet on tunnettava. On vältettävä käyttämästä kantaja-aineita, jotka ovat mahdollisesti luontaisesti myrkyllisiä (esim. asetoni, DMSO). Testikemikaalin stabiliteetti kantaja-aineessa määritetään. Jos annostelun helpottamiseksi käytetään kantaja-ainetta tai muuta lisäainetta, on syytä selvittää: sen vaikutus testiaineen absorboitumiseen ja jakautumiseen, testiaineen metaboloitumiseen ja elimistössä säilymiseen. Lisäksi on selvitettävä sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka saattavat muuttaa testiaineen myrkyllisyyttä, sekä vaikutukset koe-eläinten ravinnon ja juoman nauttimiseen tai ravitsemustilaan.

Annoksen valitseminen

20. Tutkimukseen olisi tavanomaisesti sisällyttävä vähintään kolmea annostasoa ja rinnakkainen kontrolli. Kun valitaan asianmukaiset annostasot, tutkijan olisi otettava huomioon kaikki saatavilla olevat tiedot, kuten annostiedot aikaisemmista tutkimuksista, toksikokineettiset tiedot tiineinä olevista ja muista eläimistä ja se, kuinka laajasti ainetta siirtyy maidon kautta, sekä ihmisen altistumista koskevat arviot. Jos on saatavilla toksikokineettisiä tietoja, joista käy ilmi toksikokineettisten prosessien annosriippuvainen saturaatio, olisi pyrittävä välttämään korkeita annostasoja, jotka osoittavat selvästi saturaation, jos ihmisen altistumistason oletetaan olevan hyvin paljon matalampi kuin kyllästymispiste. Tällaisissa tapauksissa suurimman annostason olisi oltava hieman suurempi kuin käännekohta, jolloin siirrytään epälineaariseen toksikokineettiseen käyttäytymiseen.

21. Jos asianmukaisia toksikokineettisiä tietoja ei ole käytettävissä, annostasojen olisi perustuttava toksisuusvaikutuksiin, ellei tätä rajoiteta testikemikaalin fysikaalisen/kemiallisen luonteen vuoksi. Jos annostasot perustuvat myrkyllisyysvaikutuksiin, suurimman annoksen valinnan tavoitteena on aiheuttaa jonkin verran systeemistä myrkyllisyyttä, mutta ei kuolemaa eikä voimakasta kärsimystä.

22. Annostasot valitaan asteittain alenevasti, jotta kaikki annostukseen liittyvät vaikutukset osoitetaan ja jotta vahvistetaan haitattomat vaikutustasot (NOAEL) tai annokset, jotka ovat lähellä havaitsemisrajaa, joiden perusteella herkimmille päätetapahtumille voidaan johtaa vertailukohtana oleva annos. Haitattomien vaikutustasojen ja alhaisimman havaittavan haittavaikutuksen aiheuttavan tason välisten suurten annosvälien välttämiseksi kaksinkertaiset tai nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat. Usein on parempi lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (esimerkiksi yli 10-kertaisia annosvälejä).

23. Kontrolliryhmän eläimiä käsitellään aivan samoin kuin koeryhmän eläimiä, paitsi että niille ei anneta testikemikaalia. Tämä ryhmä pitäisi jättää altistamatta tai sille annetaan plaseboa taikka se saa kantaja-ainetta, mikäli testikemikaalin antamisen yhteydessä käytetään kantaja-ainetta. Jos kantaja-ainetta käytetään, kontrolliryhmän pitäisi saada korkein määrä kantaja-ainetta.

Raja-annostesti

24. Tutkimus usealla annostasolla ei ole ehkä välttämätön, jos myrkyllisyyttä ei havaita annostasolla, joka on ainakin 1 000 mg/painokilo/vrk toistuvan annostelun tutkimuksissa tai jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa rakenteeltaan ja/tai metaboliavaikutuksiltaan samankaltaisista kemikaaleista, jotka ovat metabolisten ominaisuuksien *in vivo*/*in vitro* osalta samanlaisia, saatujen tietojen perusteella. Tällaisissa tapauksissa pidennetty yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskeva tutkimus voitaisiin toteuttaa käyttämällä kontrolliryhmää ja yhtä annosta, joka on ainakin 1 000 mg/painokilo/vrk. Jos kuitenkin tämän raja-annoksen käytön vuoksi löytyy todisteita lisääntymiseen tai kehitykseen liittyvästä toksisuudesta, lisätutkimuksia alemmilla annostasoilla tarvitaan haitattoman vaikutustason määrittämiseksi. Raja-annostestiä koskevia näkökohtia sovelletaan ainoastaan, jos ihmisten altistumista koskevat tiedot eivät osoita, että korkeampi annostaso on tarpeellinen.

MENETELMÄT

Poikasten altistaminen

25. Suositeltu annostelutapa on altistaminen ravinnon välityksellä. Jos letkuruokintatutkimuksia tehdään, on otettava huomioon, että poikaset saavat testikemikaalia normaalisti ainoastaan epäsuorasti maidon kautta, ennen kuin suora annostus aloitetaan vieroituksen yhteydessä. Tutkimuksissa, joissa testikemikaali annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, poikaset saavat lisäksi testikemikaalia suoraan, kun ne alkavat itse syödä imetysajan viimeisellä viikolla. Muutoksia tutkimuksen suunnitteluun olisi harkittava, jos testikemikaalia erittyy huonosti maitoon ja jos poikasten jatkuvasta altistumisesta ei ole todisteita. Näissä tapauksissa annosten antamista suoraan poikasille imetysaikana olisi harkittava olemassa olevien toksikokineettisten tietojen, poikasten toksisuuden tai biomarkkereiden muutoksien perustella (3)(4). Ennen kuin tehdään tutkimuksia poikasille imetysaikana suoraan annettavista annoksista, olisi harkittava huolellisesti etuja ja haittoja (5).

Annosteluaikataulu ja annosten antaminen

26. Jotain tietoja kiimasykleistä, urosten ja naaraiden lisääntymiselinten histopatologiasta ja kivesten/lisäkivesten siemennesteen analyysista voi olla saatavilla aikaisemmista toistuvan annostelun tutkimuksista, joiden kesto oli riittävä. Ennen sukukypsyysikää annettavan käsittelyn kestolla pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevassa tutkimuksessa pyritään siten havaitsemaan toiminnallisia muutoksia koskevat vaikutukset, jotka voivat häiritä parittelukäyttäytymistä ja hedelmöitystä. Annoksia pitäisi antaa ennen sukukypsyysikää tarpeeksi kauan, jotta saadaan aikaan tasapainoiset P-uroksien ja naaraiden altistusolosuhteet. Kummankin sukupuolen kaksiviikkoinen ennen sukukypsyysikää toteutettava käsittely katsotaan useimmissa tapauksessa riittäväksi. Naaraiden osalta tämä kattaa 3–4 kokonaista kiimasykliä, ja tämän pitäisi riittää havaitsemaan syklille aiheutuvat mahdolliset haittavaikutukset. Urosten osalta tämä vastaa ajanjaksoa, jota tarvitaan kehittyvien siittiöiden kypsymiseen lisäkiveksessä, ja tällä pitäisi voida havainnoida vaikutuksia siemennesteeseen sen jälkeen, kun se kulkeutuu pois kiveksestä (spermiaation loppuvaiheessa ja kypsyessään lisäkiveksessä) pariutumisen yhteydessä. Lopetusvaiheessa, kun suunnitellaan kivesten ja lisäkivesten histopatologista tutkimusta ja analyysia spermaparametreista, P- ja F_1-urokset on altistettu ainakin yhden täydellisen spermatogeneesisyklin ajan ((6)(7)(8)(9) ja OECD:n ohjeasiakirja 151 (40)).

27. Kokeita, joissa uroksia altistetaan ennen sukukypsyysikää, voidaan mukauttaa, jos aikaisemmissa tutkimuksissa on selvästi määritelty kiveksille aiheutuvat myrkyllisyysvaikutukset (spermatogeneesin heikentyminen) tai siemennesteen eheydelle ja toiminnalle aiheutuvat vaikutukset. Samoin naaraiden osalta, testikemikaalin tunnetuilla vaikutuksilla kiimasykliin ja siten seksuaaliseen reseptiivisyyteen voidaan perustella erilaisia ennen sukukypsyysikää suoritettavia altistuskokeita. Erityistapauksissa voi olla hyväksyttävää, että P-naaraiden käsittely aloitetaan vasta sen jälkeen, kun saadaan siemennesteen osoittava näyte (ks. OECD:n ohjeasiakirja 151 (40)).

28. Kun pariutumista edeltävä annostelujakso on otettu käyttöön, eläinten pitäisi saada testikemikaalia jatkuvasti seitsemänä päivänä viikossa ruumiinavaukseen saakka. Samaa antotapaa on käytettävä kaikille eläimille. Annosta annetaan edelleen kahden viikon pariutumisjakson aikana ja P-naaraille koko tiineyden ja imetyksen ajan vieroituksen jälkeiseen lopettamispäivään saakka. Uroksille annetaan annos samalla tavalla F_1-eläinten vieroitukseen

saakka, jolloin ne lopetetaan. Ruumiinavauksessa etusijalla pitäisi olla naaraat, joille suoritetaan ruumiinavaus samana/samantapaisena imetyspäivänä. Urosten ruumiinavaus voidaan jakaa pidemmälle aikavälille laboratoriotiloista riippuen. Valituille F_1-uroksille ja -naaraille suoraan annettava annos pitäisi aloittaa vieroituksen yhteydessä, ellei sitä jo aloitettu imetyksen aikana, ja sen pitäisi jatkua ruumiinavausajankohtaan kohortin tehtävästä riippuen.

29. Kun testikemikaalit annetaan ravintoon tai juomaveteen sekoitettuna, on tärkeää varmistaa, että testikemikaalin määrät eivät häiritse normaalia ravinto- tai nestetasapainoa. Jos testikemikaali annetaan ravintoon sekoitettuna, voidaan ilmoittaa joko testikemikaalin pitoisuus ravinnossa (ppm) tai eläimen painoon suhteutettu annos; käytetty tapa on mainittava.

30. Jos testikemikaali annetaan mahaletkulla, kerralla annettavan nesteen tilavuus ei saa ylittää 1:tä ml/100 g eläimen painoa (öljyä, kuten maissiöljyä, käytettäessä tilavuus saa olla enintään 0,4 ml/100 g eläimen painoa). Poikkeuksena tästä ovat ärsyttävät tai syövyttävät aineet, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Testiaineen nestemäärän tilavuusvaihtelua olisi minimoitava pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla varmistetaan tilavuudeltaan sama nestemäärä. Annokset annetaan samaan aikaan joka päivä. Kunkin eläinyksilön annoksen tulee yleensä perustua viimeiseen eläimen ruumiin painon määritykseen, ja sitä on mukautettava vähintään viikoittain, kun kyseessä ovat täysikasvuiset urokset ja täysikasvuiset naarat, jotka eivät ole tiineinä, ja kahden päivän välein, kun kyseessä ovat tiineenä olevat naaraat ja F_1-eläimet, jolloin annos annetaan ennen vieroitusta ja kahden viikon ajan vieroituksen jälkeen. Jos toksikokineettiset tiedot osoittavat, että testikemikaali leviää heikosti istukan kautta, letkun kautta annettavaa annosta voidaan joutua mukauttamaan tiineyden viimeisen viikon aikana, jotta emolle ei annostella liian myrkyllistä annosta. Naaraille ei anneta annosta ruokintaletkun tai minkään muun reitin kautta, jos eläintä on käsiteltävä synnytyspäivänä; testikemikaalin antamatta jättäminen kyseisenä päivänä on suositeltavaa, jotta synnytystä ei häiritä.

Pariutuminen

31. Kukin P-naaras olisi sijoitettava yhden samasta annosryhmästä satunnaisesti valitun uroksen, joka ei ole samaa alkuperää (1:1 paritus), pariksi siihen saakka, että parituksen voidaan todeta tapahtuneen taikka on kulunut kaksi viikkoa. Jos uroksia ei ole riittävä määrä esimerkiksi uroksen kuoltua ennen paritusta, uros (tai urokset), joka on jo paritellut, voidaan parittaa (1:1) toisen naaraan (toisten naaraiden) kanssa niin, että kaikki naaraat ovat paritelleet. Tiineyspäivä 0 määritellään päiväksi, jolloin todisteet pariutumisesta vahvistetaan (vaginan tulpitus tai sperma havaitaan). Eläimet olisi eroteltava mahdollisimman pian, kun todisteet pariutumisesta vahvistetaan. Jos parittelua ei ole tapahtunut kahden viikon jälkeen, eläimet olisi eroteltava, ja niitä ei enää käytetä paritteluun. Pariutuneet parit olisi selvästi täsmennettävä tiedoissa.

Poikueiden koko

32. Kunkin poikueen kokoa olisi mukautettava syntymän jälkeisenä päivänä 4 poistamalla ylimääräiset poikaset niin, että poikueeseen jää mahdollisimman tarkasti viisi urosta ja neljä naarasta. Poikasten valikoiva poistaminen esimerkiksi ruumiinpainon perusteella ei ole tarkoituksenmukaista. Jos uros- tai naaraspuolisten poikasten määrä on sellainen, että poikueeseen ei jää viittä poikasta kumpaakin sukupuolta, voidaan tehdä osittaismukautus (esimerkiksi kuusi urosta ja neljä naarasta).

Poikasten valitseminen vieroituksen jälkeisiä tutkimuksia varten (ks. kuva 1)

33. Vieroitushetkellä (noin syntymän jälkeinen päivä 21) kaikista saatavilla olevista poikueista valitaan korkeintaan 20 poikasta annos- ja kontrolliryhmää kohti jatkotutkimuksiin ja niitä pidetään siinä sukukypsyysikään saakka (ellei vaadita aiempaa testausta). Poikaset valitaan satunnaisesti, mutta ilmeisen kitukasvuisia eläimiä (eläimiä, joiden ruumiinpaino on enemmän kuin kahden keskihajonnan osalta kunkin poikueen keskimääräistä poikasen painoa alempi) ei pitäisi sisällyttää niihin, koska ne eivät ole todennäköisesti koeryhmän osalta edustavia.

Syntymän jälkeisenä päivänä 21 valitut F_1-poikaset jaetaan kolmeen kohorttiin seuraavasti:

Kohortti 1 (1A ja 1B) = lisääntymiseen ja kehitykseen liittyvän toksisuuden testaaminen

Kohortti 2 (2A ja 2B) = hermostonkehitykseen kohdistuvan toksisuuden testaaminen

Kohortti 3 = immuunijärjestelmän kehitykseen kohdistuvan toksisuuden testaaminen

Kohortti 1A: yksi uros ja yksi naaras/poikue/ryhmä (20/sukupuoli/ryhmä): etusijainen valinta lisääntymiselimille aiheutuvien vaikutusten ja yleisten toksisten vaikutusten ensisijaista arviointia varten.

Kohortti 1B: yksi uros ja yksi naaras/poikue/ryhmä (20/sukupuoli/ryhmä): etusijainen valinta F_1-eläinten lisääntymiselinten toimintaa koskevaa seurantatutkimusta varten, kun tätä tutkitaan (ks. OECD:n ohjeasiakirja 117 (39)); lisäksi pyritään saamaan histopatologisia tietoja tapauksista, joissa epäillään lisääntymis- tai hormonijärjestelmään vaikuttavia toksisia aineita, tai kun kohortin 1A tulokset ovat epävarmoja.

Kohortti 2A: yhteensä 20 poikasta ryhmää kohti (10 urosta ja 10 naarasta ryhmää kohti; yksi uros ja yksi naaras poikuetta kohti), jotka osoitetaan hermostoperäisiä käyttäytymisoireita koskeviin testeihin, ja sen jälkeen täysikasvuisina neurohistopatologisiin arviointeihin.

Kohortti 2B: yhteensä 20 poikasta ryhmää kohti (10 urosta ja 10 naarasta ryhmää kohti; yksi uros ja yksi naaras poikuetta kohti), jotka osoitetaan neurohistopatologisiin arviointeihin vieroitusajankohdalla (syntymän jälkeinen päivä 21 tai 22). Jos eläimiä ei ole riittävästi, etusijalle on asetettava eläinten osoittaminen kohorttiin 2A.

Kohortti 3: yhteensä 20 poikasta ryhmää kohti (10 urosta ja 10 naarasta ryhmää kohti; yksi uros ja yksi naaras poikuetta kohti, jos se on mahdollista). Kontrolliryhmästä voidaan tarvita muita poikasia positiivisen kontrollin eläimiksi T-soluriippuvaista vasta-ainevastetta koskevaa testiä varten syntymän jälkeisenä päivänä 56 ± 3.

34. Jos poikueessa ei ole tarpeeksi poikasia kaikkia kohortteja varten, kohortti 1 on etusijalla, koska sitä voidaan laajentaa F_2-sukupolven tuottamiseen. Muita poikasia voidaan osoittaa kaikkiin kohortteihin erityisten syiden vuoksi, esimerkiksi jos kemikaalia epäillään hermostolle, immuunijärjestelmälle tai lisääntymiselle vaaralliseksi aineeksi. Näitä poikasia voidaan käyttää tutkimuksissa eri ajankohtina tai arvioitaessa täydentäviä päätetapahtumia. Poikaset, joita ei ole osoitettu kohortteihin, toimitetaan kliiniseen biokemialliseen määritykseen (55 kohta) ja ruumiinavausta (68 kohta) varten.

P-eläinten toinen parittelu

35. Toista parittelua ei yleensä suositella P-eläimille, koska sen vuoksi menetetään tärkeitä tietoja ensimmäisen poikueen implantaatiopaikkojen määrästä (ja siten implantoinnin jälkeen tapahtuneen tiineyden keskeytymistä ja perinataalikuolemaa koskevista tiedoista, jotka osoittavat mahdollisen teratogeenisuuden). Testikemikaalia saaneille naarailleaiheutuneen vaikutuksen varmentamista tai selventämistä varten olisi parempi, jos tutkimukseen sisällytetään F_1-sukupolven pariutuminen. P-urosten toista parittelua naaraiden, jotka eivät ole saaneet testikemikaalia, kanssa voidaan kuitenkin aina käyttää vaihtoehtona epäselvien havaintojen selventämiseksi tai ensimmäisen parittelun aikana havaittujen hedelmällisyysvaikutusten määrittämiseksi laajemmin.

ELÄVIÄ ELÄIMIÄ KOSKEVAT HAVAINNOT

Kliiniset havainnot

36. P-eläinten ja valittujen F_1-eläinten osalta tehdään yleiset kliiniset havainnot kerran päivässä. Jos käytetään letkuruokintaa, kliiniset havainnot olisi tehtävä annostelua ennen ja sen jälkeen (mahdollisten plasman huippupitoisuuteen liittyvien toksisuusoireiden vuoksi). Testiin liittyvät käyttäytymistavan muutokset, vaikeat tai pitkittyneet synnytysoireet ja kaikki toksisuusoireet kirjataan. Kahdesti päivässä ja viikonloppuna kerran päivässä havainnoidaan kaikkien eläinten myrkytysvaikutuksia, sairastuvuutta ja kuolleisuutta.

37. Lisäksi kaikkien P- ja F_1-eläinten yksityiskohtaisempi tarkastelu (vieroituksen jälkeen) suoritetaan viikoittain, ja se voidaan tehdä helposti eläintä punnittaessa, millä minimoidaan käsittelyyn liittyvä rasitus. Havainnot on suoritettava tarkkaan ja kirjattava käyttämällä koelaboratorion määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä. Olisi pyrittävä varmistamaan, että testiolosuhteiden muutokset ovat mahdollisimman vähäiset. Kirjattaviin oireisiin sisältyvät, mutta eivät pelkästään, ihon, turkin, silmien, limakalvojen eritteiden erityksen sekä autonomisen hermoston toimintaan (esim. kyynelvuoto, piloerektio, mustuaisen koko, poikkeava hengitys) liittyvät muutokset. Muutokset käynnissä ja käsittelyyn liittyvässä reaktiivisuudessa sekä klooniset tai tooniset liikkeet, kaavamaiset liikkeet (esimerkiksi ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esimerkiksi itsensä silpominen, takaperin käveleminen) on kirjattava.

Eläimen paino ja ravinnon/veden kulutus

38. P-eläimet punnitaan ensimmäisenä altistuspäivänä ja sen jälkeen ainakin viikoittain. Lisäksi P-naaraat punnitaan imetyksen aikana samoina päivinä kuin poikueen poikaset (ks. 44 kohta). Kaikki F_1-eläimet punnitaan yksitellen vieroituksen yhteydessä (syntymän jälkeinen päivä 21) ja sen jälkeen ainakin viikoittain. Ruumiinpaino kirjataan myös päivänä, jolloin poikaset tulevat puberteetti-ikään (esinahka on eronnut tai emätin avautuu). Kaikki eläimet punnitaan lopetettaessa.

39. Tutkimuksen aikana ravinnon ja veden kulutus (jos testikemikaalia annostellaan juomaveden välityksellä) kirjataan ainakin kerran viikossa samoina päivinä kuin eläimen ruumiinpaino (paitsi silloin, kun eläimiä pidetään yhdessä). F_1-eläinten kunkin häkin ravinnon kulutus kirjataan viikoittain aloittaen siitä, kun eläin valitaan kuhunkin kohorttiin.

Kiimasyklit

40. Ennakkotietoja testikemikaalin kiimakierrolle aiheuttamista vaikutuksista voi olla jo saatavilla aikaisemmista toistuvan annostelun tutkimuksista, ja niitä voidaan käyttää, kun kemikaalikohtaista protokollaa suunnitellaan pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevassa tutkimuksessa. Tavanomaisesti kiimakierron arviointi (emättimen solututkimuksilla) aloitetaan käsittelyjakson alussa ja jatketaan, kunnes pariutuminen vahvistetaan tai kahden viikon pituinen pariutumisjakso päättyy. Jos naaraiden normaalia kiimakiertoa on seulottu ennen käsittelyä, niin näytteenottoa on hyödyllistä jatkaa, kun altistus aloitetaan. Jos kuitenkin altistuksen alussa esiintyy huolta epäspesifisistä vaikutuksista (kuten aluksi havaittavasta ravinnon kulutuksen vähentymisestä), eläinten voidaan antaa tottua altistukseen korkeintaan kahden viikon ajan ennen kuin aloitetaan kahden viikon näytteenottoaika, joka johtaa pariutumiseen. Jos naaraan käsittelyjaksoa jatketaan tällä tavoin (eli neljän viikon käsittely ennen parittelua), tämä olisi otettava huomioon siten, että hankitaan nuorempia eläimiä ja jatketaan urosten käsittelyjaksoa ennen parittelua. Emättimen/kohdunkaulan solujen näytteenotossa on varottava limakalvojen vahingoittamista ja siitä seuraavaa valetiineyttä (10)(11).

41. Kohortin 1A F_1-naaraiden emättimen solunäytteitä on tarkasteltava päivittäin emättimen avautumisesta siihen saakka, että ensimmäinen sarveistumisen osoittava näyte kirjataan, jotta näiden kahden tapahtuman aikaväli määritetään. Kaikkien kohortin 1A F_1-naaraiden kiimasykliä olisi myös seurattava kahden viikon ajan syntymän jälkeisestä päivästä 75 alkaen. Lisäksi, jos F_1-sukupolven parittaminen on tarpeen, kohortin 1B emättimen solututkimuksia seurataan paritteluhetkestä siihen saakka, että pariutumisesta saadaan todisteita.

Paritus ja tiineys

42. Vakiomuotoisten päätetapahtumien (kuten ruumiinpaino, ravinnon kulutus, kliiniset havainnot mukaan lukien kuolleisuuden ja sairastuvuuden tarkistaminen) lisäksi kirjataan paritusajankohdat, siemennysajankohta ja synnytysajankohta sekä lasketaan yhdyntää edeltävä väli (parituksesta siemennysajankohtaan) ja tiineyden kesto (siemennysajankohdasta synnytysajankohtaan). P-naaraiden oletetulla synnytysajankohdalla olisi tutkittava huolellisesti kaikki synnytyshäiriöihin viittaavat oireet. Kaikki pesäkäyttäytymiseen tai imetyskykyyn liittyvät poikkeavuudet olisi kirjattava.

43. Synnytysajankohta on emolle imetyspäivä 0 ja poikasille syntymän jälkeinen päivä 0. Vaihtoehtoisesti kaikki vertailut voivat myös perustua yhdynnän jälkeiseen ajankohtaan, jotta vältetään sekaannus syntymän jälkeisten kehitystietojen kanssa tiineyden kestoon liittyvien erojen vuoksi; synnytyksen ajoitus olisi myös kirjattava. Tämä on erityisen tärkeää silloin, kuin testikemikaali vaikuttaa tiineyden kestoon.

Poikasia koskevat parametrit

44. Kukin poikue tutkitaan mahdollisimman pian synnytyksen jälkeen (syntymän jälkeinen päivä 0 tai 1), jolloin määritetään poikasten lukumäärä ja sukupuoli, kuolleena ja elävänä syntyneiden poikasten määrä sekä merkittävien poikkeavuuksien esiintyminen (ulkoisesti havaittavat poikkeamat, kuten suulakihalkio; ihonalainen verenvuoto, epänormaali ihon väri tai pinta; napanuoraa koskevat havainnot, maidon puuttuminen vatsassa; kuivat eritteet). Lisäksi vastasyntyneiden ensimmäiseen kliiniseen tarkasteluun olisi sisällyttävä ruumiin lämpötilan, aktiivisuuden ja käsittelyyn liittyvän reaktiivisuuden kvalitatiivinen arviointi. Poikasista, jotka löydetään kuolleina päivänä 0, on tutkittava mahdolliset kehityshäiriöt ja kuolinsyy. Elävät poikaset lasketaan ja punnitaan kukin erikseen syntymän jälkeisenä päivänä 0 tai 1 sekä säännöllisesti sen jälkeen, ainakin syntymän jälkeisinä päivinä 4, 7, 14 ja 21. Eläimen iän perusteella sovellettavia kliinisiä tutkimuksia olisi toistettava, kun jälkeläisiä punnitaan tai useammin,

jos syntymähetkellä on tehty tapauskohtaisia havaintoja. Kirjattaviin oireisiin voivat sisältyä, mutta eivät pelkästään, ulkoiset poikkeavuudet, ihon, turkin, silmien, limakalvojen eritteiden eritykseen sekä autonomisen hermoston toimintaan liittyvät muutokset. Muutokset käynnissä ja käsittelyyn liittyvässä reaktiivisuudessa sekä klooniset tai tooniset liikkeet, kaavamaiset liikkeet tai omituinen käytös on kirjattava.

45. Peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys on mitattava kultakin poikaselta ainakin kerran syntymän jälkeisen päivän 0 ja 4 välillä. Poikasen ruumiinpaino olisi punnittava samana päivänä, kun peräaukon ja sukupuolielinten välinen etäisyys mitataan, ja tämä mittaus olisi normalisoitava poikasen koon mittauksen perusteella, mieluiten kuutiojuureen ruumiinpainosta (12). Urosten nännien/nänninpihojen esiintyvyys olisi tarkastettava syntymän jälkeisenä päivänä 12 tai 13.

46. Kaikkien valittujen F_1-eläimentä osalta tarkastellaan päivittäin urosten terskan ja esinahan eroamista tai naaraiden emättimen avautumista. Tämä aloitetaan ennen päivää, jolloin oletetaan, että päätetapahtuma tapahtuu. Näin havainnoidaan, saavutetaanko sukukypsyys varhaisessa vaiheessa. Kaikki sukuelimiin liittyvät poikkeavuudet, kuten pitkittyneet emättimessä olevat haavaumat, hypospadia tai peniksen halkeama, olisi kirjattava. F_1-eläinten sukukypsyyttä verrataan fyysiseen kehitykseen määrittelemällä ikä ja ruumiinpaino ajankohdalla, jolloin urosten terska ja esinahka eroavat toisistaan tai naaraiden emätin avautuu (13).

Hermostonkehitykseen liittyvien myrkyllisyysvaikutusten arviointi (kohortti 2A ja 2B)

47. Kymmenen urosta ja 10 naarasta kohortin 2A eläimistä ja 10 urosta ja 10 naarasta kohortin 2B eläimistä, kummastakin annosryhmästä (kutakin kohorttia kohti yksi uros ja yksi naaras; kaikissa poikueissa on ainakin yksi poikanen; satunnaisesti valittu) olisi käytettävä hermostonkehitykseen liittyvien myrkyllisyysvaikutusten arvioimiseen. Kohortin 2A eläinten osalta olisi tehtävä arvio akustisesta säpsähdysvasteesta, toimintaa ja havainnointia koskeva testisarja sekä motorista aktiviteettia koskevat (ks. 48–50 kohta) ja neuropatologiset arvioinnit (ks. 74–75 kohta). Olisi pyrittävä varmistamaan, että testiolosuhteiden muutokset ovat mahdollisimman vähäiset ja että ne eivät liity järjestelmällisesti käsittelyyn. Muuttujat, jotka voivat vaikuttaa käyttäytymiseen, ovat äänitaso (kuten äkkinäiset kovat äänet), lämpötila, kosteus, valaistusolosuhteet, hajut, ajankohta ja ympäristön häiriötekijät. Hermostonkehitykseen liittyvien myrkyllisyysvaikutusten testien tuloksia olisi tulkittava suhteessa asianmukaisen aikaisemman kontrollin vertailuväleihin. Kohortin 2B eläimiä olisi käytettävä hermostonkehitykseen liittyvien myrkytysvaikutusten arvioinnissa syntymän jälkeisenä päivänä 21 tai 22 (ks. 74–75 kohta).

48. Akustista säpsähdysvastetta koskeva testi olisi suoritettava syntymän jälkeisenä päivänä 24 (± 1 päivä) käyttäen kohorttia 2A. Testauspäivää olisi tasapainotettava annosta saaneiden ryhmien ja kontrolliryhmien välillä. Jokaiseen testikokonaisuuteen sisältyy 50 testiä. Akustista säpsähdysvastetta koskevan testin suorituksessa olisi määriteltävä keskimääräinen vasteamplitudi kussakin 10 testin ryhmässä (viisi 10 testin ryhmää), ja testausolosuhteita olisi optimoitava testijakson sisäisen sopeutumisen aikaansaamiseksi. Näiden menettelyiden olisi oltava yhdenmukaisia testimenetelmän B.53 kanssa (35).

49. Syntymän jälkeisen päivän 63 ja 75 välisellä asianmukaisella ajankohdalla kohortin 2A eläimille suoritetaan toimintaa ja havainnointia koskeva testisarja ja motorista aktiviteettia koskeva automaattinen testi. Näiden menettelyiden olisi oltava yhdenmukaisia testimenetelmän B.43 (33) ja B.53 kanssa (35). Toimintaa ja havainnointia koskevaan testisarjaan sisältyy eläimen ulkonäköä, käyttäytymistä ja toiminnallista eheyttä koskeva yksityiskohtainen kuvaus. Tätä arvioidaan tekemällä havaintoja kotihäkissä, sen jälkeen kun eläin on siirretty havainnointia varten avoimelle kentälle, jossa se liikkuu vapaasti, ja eläinten käsittelyyn liittyvillä testeillä. Testauksen on edettävä vähiten interaktiivisesta eniten interaktiiviseen testiin. Luettelo toimenpiteistä esitetään liitteessä 1. Koulutettujen teknikoiden, jotka eivät ole tietoisia eläinten käsittelytiedoista, olisi havainnoitava tarkasti kaikkia eläimiä, käyttäen standardoituja menettelyitä, joilla vähimmäistetään tarkkailijan ennakkokäsitykset. On suositeltavaa, että eläimiin liittyvät havainnoinnit tietyssä tutkimuksessa tekee sama teknikko, kun tämä on mahdollista. Jos tämä ei ole mahdollista, tarvitaan jotain näyttöä tarkkailijoiden keskinäisen toiminnan luotettavuudesta. Käytöstä mittaavan testisarjan kunkin parametrin osalta käytetään nimenomaisia toiminnallisesti määriteltyjä asteikkoja ja pisteytyskriteerejä. Jos mahdollista, havaintoja koskevia päätetapahtumia, joissa on kyse subjektiivisista sijalukutesteistä, varten olisi kehitettävä objektiivisia määrällisiä toimenpiteitä. Kutakin eläintä testataan erikseen motorisen aktiviteetin osalta. Testikokonaisuuden olisi kestettävä riittävän kauan, jotta kontrolleja varten voidaan osoittaa, että eläin on sopeutunut testeihin. Motorista toimintaa olisi valvottava toimintaa mittaavalla automaattilaitteella, jolla voidaan selvittää toiminnan vähentyminen ja lisääntyminen (eli laitteen mittaaman lähtötilanteen ei pitäisi olla niin alhainen, että toiminnan vähentymisen havaitseminen estetään, eikä niin suuri, että estetään toiminnan lisääntymisen havaitseminen). Kutakin laitetta olisi testattava vakiomuotoisilla menettelyillä, jotta toiminnan luotettavuus varmistetaan mahdollisuuksien mukaan laitteiden ja tutkimuspäivien osalta. Testiryhmiä olisi mahdollisuuksien mukaan tasapainotettava laitteisiin nähden. Testiryhmiä olisi tasapainotettava testiajankohtiin nähden, jotta vältetään häiritsemästä toiminnan vuorokausirytmiä.

50. Jos olemassa olevat tiedot osoittavat, että tarvitaan muuta toimintaa koskevaa testausta (esim. aistien, sosiaalinen tai kognitiivinen testaus), nämä sisällytetään toimiin ilman, että tutkimuksessa käytettyjen muiden arviointien eheyttä häiritään. Jos tällaiset testit suoritetaan samoilla eläimillä, joita on käytetty vakiomuotoisiin akustista

säpsähdysvastetta, toimintaa ja havainnointia sekä motorista aktiviteettia koskeviin testeihin, olisi suunniteltava erilaisia testejä, joilla vähimmäistetään riski näiden testien eheyden vaarantamisesta. Täydentävät tutkimukset voivat olla erityisen hyödyllisiä, kun empiiriset havainnot tai ennakoidut vaikutukset taikka menettely/vaikutustapa osoittavat tietyntyyppisen neurotoksisen vaikutuksen.

Immuunijärjestelmän kehitykseen kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten arviointi (kohortti 3)

51. Syntymän jälkeisenä päivänä 56 (± 3 päivää) kymmenen urosta ja 10 naarasta kohortin 3 eläimistä kummastakin koeryhmästä (kutakin kohorttia kohti yksi uros ja yksi naaras; kaikissa poikueissa on ainakin yksi poikanen; satunnaisesti valittu poikanen) olisi käytettävä T-soluriippuvaista vasta-ainevastetta koskevaa testiä varten — eli primaarista IgM-vasta-ainevastetta T-soluriippuvaiseen antigeeniin, kuten lampaan punasoluihin (SRBC) tai maljakotilon hemosyaniiniin (keyhole limpet hemocyanin, KLH) –, joka on yhdenmukainen tämänhetkisten immuunijärjestelmään kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten testausmenetelmien kanssa (14)(15). Vastetta voidaan arvioida laskemalla erityiset plakkia muodostavat solut (PFC) pernassa tai määrittämällä ELISA-testissä SRBC- tai KLH-spesifisen IgM-vasta-aineen titteri vastehuipun aikana. Vasteen huippu on tavanomaisesti neljän (PFC-vaste) tai viiden (ELISA-testi) vuorokauden kuluttua laskimonsisäisestä immunisaatiosta. Jos primaarista vasta-ainevastetta testaan laskemalla plakkia muodostavat solut, eläinten alaryhmiä voidaan arvioida eri päivinä edellyttäen, että: alaryhmien immunisaatio ja lopettaminen ajoitetaan siten, että PFC:t lasketaan reaktiohuipun aikana; alaryhmiin sisältyy yhtä monta uros- ja naaraspuolista poikasta kaikista koeryhmistä, mukaan lukien kontrolliryhmät; ja että alaryhmiä arvioidaan suunnilleen samalla syntymän jälkeisellä iällä.Testikemikaalille altistaminen jatkuu ajankohtaan, jolloin perna kerätään PFC-vastetta tai seerumi kerätään ELISA-testiä varten.

Lisääntymiseen mahdollisesti kohdistuvien myrkyllisyysvaikutusten arvioinnin seuranta (kohortti 1B)

52. Kohortin 1B eläinten altistusta voidaan jatkaa syntymän jälkeisen päivän 90 jälkeen ja ne voivat tarvittaessa saada F_2-sukupolven poikasia. Saman annosryhmän urosten ja naaraiden olisi oltava samassa häkissä (välttäen sisarusten parittamista) enintään kahden viikon ajan syntymän jälkeisestä päivästä 90 alkaen tai sen jälkeen, mutta ei kauempaa kuin syntymän jälkeinen päivä 120. Menettelyiden pitäisi olla samankaltaisia kuin mitä sovelletaan P-eläimiin. Näytön perusteella voi kuitenkin riittää, että poikueet lopetetaan syntymän jälkeisenä päivänä 4 sen sijaan, että niitä seurataan vieroitukseen saakka tai sen jälkeen.

LOPETTAMISTA KOSKEVAT NÄKÖKOHDAT

Kliininen biokemia/hematologia

53. P-eläimille aiheutuvia systeemisiä vaikutuksia olisi seurattava. Paaston jälkeisiä verinäytteitä otetaan määritellyistä paikoista kymmeneltä satunnaisesti valitulta P-urokselta ja naaraalta annosryhmää kohti lopetettaessa. Ne säilytetään asianmukaisissa olosuhteissa, ja niille tehdään osittainen tai täysimittainen veritutkimus, kliininen biokemiallinen tutkimus, T4:ää tai TSH:tä mittaava testi tai muita testejä testikemikaalin tunnettuja vaikutuksia koskevan profiilin perusteella (ks. OECD:n ohjeasiakirja 151 (40)). Seuraavia verenkuvan parametreja olisi tarkasteltava: hematokriitti, hemoglobiinipitoisuus, punasolujen määrä, valkosolujen määrä yhteensä ja erittelylaskenta, verihiutaleiden määrä ja veren hyytymisaika ja/tai -potentiaali. Plasman tai seerumin tarkasteluun olisi sisällyttävä: glukoosi, kokonaiskolesteroli, urea, kreatiniini, valkuaisaine yhteensä, albumiini ja ainakin kaksi entsyymiä, jotka osoittavat maksasoluvaikutuksia (kuten alaniiniaminotranferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, alkalinen fosfataasi, gammaglutamyylitranspeptidaasi ja sorbitolidehydrogenaasi). Muiden entsyymien ja sappihappojen mittaus voi tarjota joissain tapauksissa hyödyllistä tietoa. Lisäksi kaikista eläimistä voidaan ottaa verta ja säilyttää sitä mahdolliseen myöhemmin toteutettavaan analyysiin, jolla autetaan selventämään epäselviä vaikutuksia tai tuottamaan sisäistä altistumista koskevia tietoja. Jos P-eläimiä ei aiota parittaa toisen kerran, verinäytteet kerätään juuri ennen tai osana menetelmää suunnitellun lopettamisen yhteydessä. Jos eläimiä ei lopeteta, verinäytteet olisi kerättävä muutama päivä ennen kuin eläimet paritetaan toisen kerran. Elleivät olemassa olevat tiedot toistuvan annostelun tutkimuksista osoita, että testikemikaali ei vaikuta parametreihin, ennen lopettamista olisi tehtävä virtsa-analyysi, ja seuraavia parametreja olisi arvioitava: ulkonäkö, tilavuus, osmolaalisuus tai ominaistiheys, pH-arvo, valkuaisaine, glukoosi, veri ja verisolut, solujäte. Virtsaa voidaan myös kerätä testikemikaalin ja/tai metaboliittien erittymisen seurantaa varten.

54. F_1-eläimille aiheutuvia systeemisiä vaikutuksia olisi myös seurattava. Paaston jälkeisiä verinäytteitä otetaan määritellyistä paikoista kymmeneltä satunnaisesti valitulta kohortin 1A urokselta ja naaraalta annosryhmää kohti lopetettaessa. Ne säilytetään asianmukaisissa olosuhteissa, ja niille tehdään vakiomuotoinen kliininen biokemiallinen tutkimus, mukaan lukien kilpirauhashormonien (T4 ja TSH) seerumitason arviointi, veritutkimus (punasolujen ja valkosolujen määrä yhteensä ja erittelylaskenta) ja virtsa-analyysi.

55. Lopuille poikasille tehdään syntymän jälkeisenä päivänä 4 ruumiinavaus. Samalla harkitaan seerumin kilpirauhashormonin (tetrajodityroniini, T4) pitoisuuksien mittaamista. Tarvittaessa vastasyntyneiden (syntymän jälkeinen päivä 4) veri voidaan eritellä poikueittain biokemiallisia/kilpirauhashormonin analyyseja varten. Verta kerätään T4- ja TSH-analyysiin vastavieroitetuilta eläimiltä, joille tehdään ruumiinavaus syntymän jälkeisenä päivänä 22 (F_1-poikasia, joita ei ole valittu kohortteihin).

Siemennestettä koskevat parametrit

56. Kaikkien P-sukupolven urosten siemennestettä koskevia parametreja olisi mitattava, ellei ole tietoja, jotka osoittavat, että näihin parametreihin ei kohdistu vaikutuksia 90 vuorokauden tutkimuksessa. Kaikille kohortin 1A uroksille olisi tehtävä siemennestettä koskevien parametrien tarkastelu.

57. Lopettamisen yhteydessä kaikkien P- ja F_1- (kohortti 1A) urosten kivesten ja lisäkivesten paino kirjataan. Ainakin yksi kives ja yksi lisäkives varataan histopatologista tutkimusta varten. Jäljelle jäänyttä lisäkivestä käytetään lisäkiveksen hännän siemennesteen varastojen määrittelyyn (16)(17). Lisäksi lisäkiveksen hännän (tai siemenjohtimen) siemenneste kerätään käyttämällä menettelyitä, joilla vähimmäistetään siittiöiden liikkuvuuden ja morfologian arvioinnille aiheutuvat vahingot (18).

58. Siittiöiden liikkuvuutta voidaan arvioida välittömästi lopettamisen jälkeen tai tämä voidaan merkitä muistiin myöhempää analyysiä varten. Progressiivisesti liikkuvien siittiöiden prosenttiosuus voidaan määritellä subjektiivisesti tai objektiivisesti tietokoneavusteisella liikkuvuusanalyysilla (19)(20)(21)(22)(23)(24). Siittiöiden morfologista arviota varten lisäkiveksen tai siemenjohtimen siemenneste tutkitaan fiksatiivikäsiteltynä tai märkäpreparaattina (25) ja vähintään 200 siittiötä/näyte luokitetaan joko normaaliksi (pää ja keskiosa/häntä vaikuttavat normaalilta) tai epänormaaliksi. Morfologisiin siemennesteen epänormaaliuksiin kuuluvat siittiöiden fuusio, eristyneet päät sekä päiden tai häntien epämuodostuma (26). Siittiöiden epämuodostuneet tai suuret päät voivat osoittaa kehityshäiriön spermiaatiossa.

59. Jos siittiönäytteet pakastetaan, näytteet fiksoidaan ja siittiöiden liikkuvuuden arviointia koskevat kuvat otetaan talteen ruumiinavaushetkellä (27), myöhempää analyysiä voidaan rajoittaa kontrolliryhmän ja korkean annosryhmän uroksiin. Jos kuitenkin käsittelyyn liittyviä vaikutuksia havaitaan, alempia annosryhmiä olisi myös arvioitava.

Ruumiinavaus

60. Kun eläimet lopetetaan tai ne kuolevat testin aikana, kaikille P- ja F_1-eläimille tehdään ruumiinavaus ja ne tutkitaan silmämääräisesti mahdollisten rakenteellisten epämuodostumien tai patologisten muutosten vuoksi. Erityistä huomiota olisi kiinnitettävä lisääntymiselimiin. Kuolemaisillaan olevat inhimillisellä tavalla lopetettavat poikaset ja kuolleet poikaset olisi kirjattava, ja mikäli niiden ruumiin kunto sallii, olisi tutkittava niiden mahdolliset kehityshäiriöt ja/tai kuolinsyy, ja ruumiit säilötään.

61. Täysikasvuisten P- ja F_1-naaraiden osalta emättimen solunäytettä tarkastellaan ruumiinavauspäivänä, jotta kiimasyklin vaihe määritellään ja jotta voidaan mahdollistaa korrelaatio lisääntymiselinten histopatologisen tutkimuksen kanssa. Kaikkien P-sukupolven naaraiden (ja soveltuvin osin F_1-naaraiden) kohdut tutkitaan implantaation esiintyvyyden ja määrän osalta niin, että histopatologista arviointia ei haitata.

Elinten paino ja kudosten säilyttäminen — täysikasvuiset P- ja F_1-eläimet

62. Kun eläin lopetetaan, asiaankuuluvien kohorttien kaikkien P-eläinten ja kaikkien F_1-eläinten ruumiinpaino ja (jäljempänä lueteltujen) elinten märkäpainot määritetään mahdollisimman nopeasti dissektion jälkeen, jotta ne eivät pääse kuivumaan. Näitä elimiä olisi säilytettävä sen jälkeen asianmukaisissa olosuhteissa. Ellei toisin mainita, parilliset elimet voidaan punnita erikseen tai yhdessä, testin suorittavan laboratorion tavanomaisen käytännön mukaisesti.

— kohtu (ja munajohtimet sekä kohdunkaula), munasarjat

— kivekset, lisäkivekset (kokonaispaino ja häntä siittiöiden määrän laskemiseen käytetyissä näytteissä)

— eturauhanen (dorsolateraalinen ja ventraalinen osa yhdessä). Eturauhasen yhdistelmää puhdistettaessa olisi pidettävä huolta, että nestettä sisältäviä rakkularauhaisia ei puhkaista. Jos eturauhasen kokonaispainolle aiheutuu vaikutuksia käsittelystä, dorsolateraalinen ja ventraalinen osa olisi leikattava huolellisesti erilleen fiksaation jälkeen ja punnittava erikseen

— rakkularauhaset ja eturauhasen etuosa sekä niiden nesteet (yhtenä kokonaisuutena)

— aivot, maksa, munuaiset, sydän, perna, kateenkorva, aivolisäke, kilpirauhanen (fiksaation jälkeen) ja lisämunuaiset sekä määritetyt kohde-elimet ja -kudokset.

63. Edellä mainittujen elinten lisäksi asianmukaisissa olosuhteissa olisi säilytettävä näytteitä seuraavista: ääreishermosto, lihakset, selkäydin, silmät ja näköhermo, maha-suolikanava, virtsarakko, keuhkot, henkitorvi (ja siihen liittyvä kilpirauhanen ja lisäkilpirauhanen), luuydin, siemenjohdin (urokset), rintarauhasen rauhanen (urokset ja naaraat) ja emätin.

64. Kohortin 1A eläinten kaikki elimet punnitaan ja säilytetään histopatologista tutkimusta varten.

65. Ennen syntymää ja sen jälkeen aiheutettujen immunotoksisten vaikutusten tutkintaa varten kymmenelle urokselle ja 10 naaraalle kohortin 1A eläimistä kummastakin annosryhmästä (yksi uros ja yksi naaras poikuetta kohti; kaikissa poikueissa on ainakin yksi poikanen; satunnaisesti valittu poikanen) olisi toteutettava seuraavat toimenpiteet niiden lopettamisen jälkeen:

— punnitaan imusolmukkeet, jotka liittyvät altistumisreittiin ja jotka sijaitsevat siitä etäämmällä (kaikille kohortin 1A eläimille jo tehdyn lisämunuaisten, kateenkorvan ja pernan punnituksen lisäksi)

— analysoidaan pernan lymfosyyttien alapopulaatioita (CD4+- ja CD8+-lymfosyytit, T-lymfosyytit, B-lymfosyytit ja luonnolliset tappajasolut) käyttäen pernan yhtä puoliskoa, ja toinen puolisko säilytetään histopatologista arviointia varten.

Pernan lymfosyyttien alaluokkien analyysilla eläimillä, joita ei ole immunisoitu (kohortti 1 A), määritetään, liittyykö altistus muutoksiin 'auttajasolun' (CD4+) tai sytotoksisten (CD8+) kateenkorvasta peräisin olevien lymfosyyttien taikka luonnollisten tappajasolujen immunologisesti vakaassa jakaumassa (nopea reagointi neoplastisiin soluihin ja patogeeneihin).

66. Kohortin 1 B eläinten seuraavat elimet punnitaan ja vastaavat kudokset käsitellään ryhmätasoa varten:

— emätin (ei punnita)

— kohtu ja kohdunkaula

— munasarjat

— kivekset (ainakin yksi)

— lisäkivekset

— rakkularauhaset ja eturauhasen etuosa

— eturauhanen

— aivolisäke

— määritetyt kohde-elimet.

Kohortin 1B histologinen tutkimus suoritetaan, jos kohortin 1A tulokset ovat epävarmoja tai jos epäillään lisääntymis- tai hormonijärjestelmään vaikuttavia toksisuutta aiheuttavia aineita.

67. Kohortit 2A ja 2B: hermostonkehitykseen kohdistuvan myrkyllisyysvaikutuksen testaaminen (syntymän jälkeinen päivä 21 tai 22 ja täysikasvuiset poikaset). Kohortin 2A eläimet lopetetaan käyttäytymistä mittaavan testin jälkeen, aivojen painot kirjataan ja täydellinen neurohistologinen tutkimus tehdään neurotoksisuutta koskevaa arviota varten. Kohortin 2B eläimet lopetetaan syntymän jälkeisenä päivänä 21 tai 22, aivojen painot kirjataan ja aivoista tehdään mikroskooppitutkimus neurotoksisuutta koskevaa arviota varten. Kohortin 2A eläimille on käytettävä perfuusiofiksaatiota, mikä on vapaaehtoista kohortin 2B eläimille testimenetelmän B.53 mukaisesti (35).

Elinten paino ja kudosten säilyttäminen — vastavieroitetut F_1-eläimet

68. Poikaset, joita ei ole valittu kohortteihin, mukaan lukien kitukasvuiset eläimet, lopetetaan vieroituksen jälkeen syntymän jälkeisenä päivänä 22, elleivät tulokset osoita tarvetta täydentäville elävillä eläimillä tehtäville tutkimuksille. Lopetetuille poikasille tehdään ruumiinavaus mukaan lukien lisääntymiselimiä koskeva arviointi, kuten kuvataan 62 ja 63 kohdassa. Enintään 10 poikaselta sukupuolta ja ryhmää kohti (mahdollisimman monesta poikueesta) punnitaan aivot, perna ja kateenkorva, ja ne säilytetään asianmukaisissa olosuhteissa. Lisäksi näiden uros- ja naaraspuolisten poikasten rintarauhaskudosta voidaan säilyttää täydentävää mikroskooppianalyysia varten ([1]) (ks. OECD:n ohjeasiakirja 151 (40)). Paljain silmin havaittavat poikkeavuudet ja kohdekudokset on säilytettävä mahdollista histologista tutkimusta varten.

([1]) Tutkimuksissa on käynyt ilmi, että rintarauhanen ja erityisesti rintarauhasen kehittyminen varhaisessa kehitysvaiheessa on estrogeenisen toiminnan osalta herkkä päätetapahtuma. On suositeltavaa, että päätetapahtumat, joihin käytetään kumpaakin sukupuolta olevien poikasten rintarauhasia, sisällytetään tähän testimenetelmään, kun se validoidaan.

Histopatologia — P-eläimet

69. Edellä 62 ja 63 kohdassa lueteltujen elinten täydellinen histopatologia suoritetaan kaikista suuren annoksen ja kontrolliryhmän P-eläimistä. Ne elimet, joissa todetaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, olisi tutkittava myös kaikilta pienempiä annoksia saavilta eläimiltä, jotta haitaton vaikutustaso voidaan määritellä. Histopatologinen arviointi olisi tehtävä lisäksi kaikista suurista vaurioista sekä kaikista sellaisten eläinten lisääntymiselimistä, joiden hedelmällisyyden epäillään vähentyneen, eli niiden, jotka eivät paritelleet, tulleet tiineiksi, siittäneet tai synnyttäneet terveitä poikasia tai joiden kiimakiertoon tai siittiöiden määrään, liikkuvuuteen tai morfologiaan vaikutettiin.

Histopatologia — F_1-eläimet

Kohortin 1 eläimet

70. Edellä 62 ja 63 kohdassa lueteltujen elinten täydellinen histopatologia suoritetaan kaikista suuren annoksen ryhmän ja täysikasvuisten kontrolliryhmän 1A-eläimistä. Kaikissa poikueissa olisi oltava ainakin 1 poikanen sukupuolta kohti. Elimet ja kudokset, joissa todetaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, ja kaikki suuret vauriot olisi tutkittava myös kaikilta eläimiltä, jotka saavat pienempiä annoksia, jotta voidaan määritellä haitaton vaikutustaso. Syntymää ennen ja sen jälkeen imukudoselimille aiheutettujen vaikutusten arviointia varten myös kerättyjen imusolmukkeiden ja luuytimen histopatologia olisi arvioitava kohorttiin 1A kuuluvalta 10 urokselta ja 10 naaralta kaikkien 1A eläinten keskuudessa tehdyn kateenkorvan, pernan ja lisämunuaisten arvioinnin lisäksi.

71. Kaikkien kohortin 1 B eläinten lisääntymiselinten kudoksia ja endokriinisia kudoksia, jotka on käsitelty 66 kohdassa tarkoitetulle ryhmätasolle, olisi tutkittava histopatologisesti, jos epäillään lisääntymis- tai hormonijärjestelmään vaikuttavia toksisia aineita. Kohortista 1B olisi tehtävä myös histologinen tutkimus, jos kohortin 1A tulokset ovat epäselvät.

72. Täysikasvuisten naaraiden munasarjoihin pitäisi sisältyä varhaismunarakkuloita ja kasvavia munarakkuloita sekä suuria keltarauhasia; tästä syystä histopatologisessa tutkimuksessa on pyrittävä osoittamaan F_1-naaraiden varhaismunarakkuloiden ja pienten kasvavien munarakkuloiden sekä suurten keltarauhasten määrällinen arvio; eläinten määrän, munasarjaleikkeen valinnan sekä leikkeen näytekoon olisi oltava tilastollisesti asiamukainen käytettyyn arviointimenettelyyn nähden. Munarakkuloiden määrä lasketaan ensin kontrolli- ja korkean annoksen ryhmän eläimillä, ja jos jälkimmäisessä ryhmässä esiintyy haitallisia vaikutuksia, olisi tarkasteltava alemman annoksen ryhmiä. Tutkimukseen sisältyy varhaismunarakkuloiden määrän laskenta. Tämä voidaan yhdistää pienten kasvavien munarakkuloiden määrän laskentaan, jotta käsiteltyjä munasarjoja ja kontrolliryhmän munasarjoja voidaan verrata (ks. OECD:n ohjeasiakirja 151 (40)). Keltarauhasen arviointi olisi suoritettava samanaikaisesti kiimakiertoa koskevan testin kanssa, jotta kiimakierron vaihe voidaan ottaa huomioon arvioinnissa. Munajohtimet, kohtu ja emätin tutkitaan asianmukaisen elimelle tyypillisen kehityksen suhteen.

73. F_1-uroksille tehdään yksityiskohtaiset kivesten histopatologiset tutkimukset, jotta käsittelyyn liittyvät vaikutukset kivesten erilaistumiselle ja kehitykselle sekä spermatogeneesille tunnistetaan (38). Jos mahdollista, tutkitaan kiveksen verkon (rete testis) osia. Lisäkiveksen pää, runko ja häntä sekä siemenjohdin tutkitaan elimelle tyypillisen kehityksen suhteen samoin kuin P-uroksilta edellytetyt parametrit.

Kohortin 2 eläimet

74. Neurohistopatologinen tutkimus suoritetaan kaikille korkean annoksen ja kontrolliryhmän kohortin 2A eläimille sukupuolta kohden hermostoperäisiä käyttäytymisoireita koskevan testin loppuunsaattamisen jälkeen (syntymän jälkeisen päivän 75 jälkeen, mutta ennen päivää 90). Aivojen histopatologinen tutkimus suoritetaan kaikille korkean annoksen ja kontrolliryhmän kohortin 2A eläimille sukupuolta kohden syntymän jälkeisenä päivänä 21 tai 22. Elimet ja kudokset, joissa todetaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, olisi tutkittava myös kaikilta eläimiltä, jotka ovat pienempiä annoksia saavissa ryhmissä, jotta haitaton vaikutustaso voidaan määritellä. Kohortin 2A ja 2B eläinten osalta olisi tutkittava useita aivojen osia, jotta voidaan tarkastella hajukäämejä, aivokuorta, hippokampusta, tyvitumakkeita, talamusta, hypotalamusta, keskiaivoja (keskiaivojen kattoa, keskiaivojen peitettä ja pikkuaivovarsia), aivorunkoa ja pikkuaivoja. Pelkästään kohortin 2A osalta tarkastellaan silmiä (verkkokalvo ja silmähermo) ja näytteitä ääreishermostosta, lihaksista ja selkäytimestä. Kaikkien neurohistologisten menettelyiden olisi oltava yhdenmukaisia testimenetelmän B.53 kanssa (35).

75. Aivojen edustavista alueista olisi tehtävä morfometriset (kvantitatiiviset) arvioinnit (homologiset kohdat, jotka on valittu huolellisesti luotettavien mikroskooppisten tuntomerkkien perusteella), ja niihin voi sisältyä lineaarinen ja/tai pinta-alaa koskeva mittaus tietyistä aivojen alueista. Kunkin tunnusmerkin (taso) osalta olisi otettava ainakin kolme yhdensuuntaista leikettä, jotta valitaan homologisin ja edustavin osa arvioitavasta tietystä aivon alueesta. Neuropatologin olisi ratkaistava asianmukaisesti, ovatko mittausta varten valmistellut leikkeet homologisia muiden

näytteiden kanssa ja voidaanko ne sisällyttää tutkimukseen, koska erityisesti lineaariset mittaustulokset voivat muuttua suhteellisen lyhyellä etäisyydellä (28). Ei-homologisia leikkeitä ei saa käyttää. Tarkoitus on ottaa näytteitä kaikilta tähän tarkoitukseen varatuilta eläimiltä (10/sukupuoli/annosryhmä), mutta pienempi määrä voi silti riittää. Alle kuudelta eläimeltä/sukupuoli/annosryhmä otettavia näytteitä ei pidetä kuitenkaan yleensä riittävänä tätä testimenetelmää varten. Stereologiaa voidaan käyttää täsmentämään testeihin liittyvät vaikutukset, jotka kohdistuvat parametreihin, kuten tiettyjen neuroanatomisten alueiden volyymi tai solumäärä. Kaikissa kudosnäytteiden valmistelua koskevissa toimissa kudosten fiksoinnista kudosnäytteiden dissektioon, kudosten käsittelyyn ja objektilasien värjäykseen saakka olisi käytettävä tasapainottavaa mallia, jotta jokaiseen erään sisältyy edustavia näytteitä kustakin annosryhmästä. Morfometristä tai stereologista analyysia varten aivokudos olisi valettava sopivaan aineeseen kaikilla annostasoilla samaan aikaan, jotta vältetään kutistuneet artefaktit, jotka voivat liittyä pitkäaikaiseen säilytykseen fiksatiivissa.

TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Tiedot

76. Tiedot olisi esitettävä erikseen ja yhteenvetona taulukossa. Kustakin testiryhmästä ja sukupolvesta ilmoitetaan soveltuvissa tapauksissa seuraavaa: eläinten määrä testin alussa, testin aikana kuolleiden tai inhimillisistä syistä lopetettujen eläinten määrä, kuoleman tai lopettamisen aika, lisääntymiskykyisten eläinten määrä, tiineiden naaraiden määrä, niiden naaraiden määrä, jotka synnyttävät poikueen ja niiden eläinten määrä, joissa myrkyllisyysvaikutuksia on havaittavissa. Myrkytysoireet olisi kirjattava mukaan lukien oireiden alkamispäivä, kesto ja voimakkuus.

77. Numeeriset tulokset arvioidaan tarkoituksenmukaista ja hyväksyttyä tilastollista menetelmää käyttäen. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimuksen suunnitteluvaiheessa, ja niissä olisi otettava asianmukaisesti huomioon faktuaaliset tiedot (esim. laskutiedot), tiettyjen arvojen määrää mittaavat tiedot (esim. rajoitettu havainnointiaika) ei-riippumattomat tiedot (esim. vaikutukset poikueisiin ja toistetut toimenpiteet) ja erisuuret varianssit. Yleistetyt lineaariset sekamallit ja annosvastemallit kattavat laajan luokan analyyttisiä välineitä, jotka voivat soveltua tästä testimenetelmästä saaduille tiedoille. Raporttiin pitäisi sisältyä riittävästi tietoa analyysimenetelmästä ja käytetystä tietokoneohjelmasta, jotta riippumaton arvioija/tilastoasiantuntija voi niiden avulla arvioida/arvioida uudelleen analyysin.

Tulosten arviointi

78. Löydökset — mukaan lukien ruumiinavauslöydökset ja mikroskooppiset löydökset — on arvioitava havaittujen vaikutusten pohjalta. Arviointiin sisältyy annoksen ja epämuodostumien tai häiriöiden, mukaan lukien vakavat vauriot, esiintyvyyden ja vaikutusten vakavuuden välinen mahdollinen suhde. Kohde-elimiä, vaikutuksia hedelmällisyyteen, kliinisiä häiriöitä, vaikutuksia lisääntymiskykyyn ja poikueen kokoon/laatuun, ruumiinpainon muutoksia, vaikutuksia kuolleisuuteen sekä muita myrkyllisyysvaikutuksia ja kehitysvaikutuksia olisi myös arvioitava. Sukupuolikohtaisiin muutoksiin olisi kiinnitettävä erityistä huomiota. Testikemikaalin fysikokemialliset ominaisuudet ja toksikokineettiset tiedot, kun ne ovat saatavilla, mukaan lukien kemikaalin leviäminen istukan kautta ja maidon erittyminen, olisi otettava huomioon testitulosten arvioinnissa.

Tutkimusseloste

79. Tutkimusselosteen on sisällettävä seuraavat tiedot, jotka on saatu tässä tutkimuksessa P-, F_1- ja F_2-eläimiltä (soveltuvin osin):

Testikemikaali:

— kaikki asianmukaiset saatavilla olevat tiedot testikemikaalin kemiallisista, toksikokineettisista ja toksikodynaamisista ominaisuuksista

— tunnistetiedot

— puhtaus.

Kantaja-aine (tarvittaessa):

— jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

Koe-eläinlajit:

— käytetty eläinlaji ja kanta

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— toimittaja, häkit, ravinto, pesäntekoaineet ja niin edelleen

— kunkin eläimen paino testin alussa

— P-naaraiden emättimen solunäytetiedot ennen käsittelyn alkua (jos tiedot kerätään tuolloin)

— P-sukupolven paritusta koskevat tiedot, joissa mainitaan uros- ja naaraspuolinen parittelukumppani ja parittelun onnistuminen

— alkuperäispoikuetta koskevat tiedot täysikasvuisista F_1-sukupolven eläimistä

Testiolosuhteet:

— annostasojen valintaperusteet

— yksityiskohdat testikemikaalin koostumuksesta/ravintovalmisteesta, valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta

— valmisteen stabiliteetti ja homogeenisuus kantaja-aineessa tai välittäjässä (esim. ravinto, juomavesi), veressä ja/tai maidossa käyttöä ja varastointia koskevien edellytysten mukaisesti käyttökertojen välillä

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin antotavasta

— muuntokerroin ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudelle (ppm) todelliseen annokseen (mg/painokilo/vrk) nähden (tarvittaessa)

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta (mukaan lukien ravinnon koostumus, mikäli saatavissa)

— yksityiskohtainen kuvaus satunnaisotosta koskevista menettelyistä, joita käytetään poikasten karsitaan ja kun niitä valitaan koeryhmiin

— ympäristöolosuhteet

— luettelo tutkimushenkilöstöstä mukaan lukien ammatillinen koulutus.

Tulokset (yhteenveto ja yksilökohtaiset tiedot sukupuolittain ja annostason perusteella):

— ravinnonotto sekä nautitun veden määrä, mikäli se on mitattu, ravinnon tehokkuus (ruumiinpainon lisäys nautittua ravintogrammaa kohti lukuun ottamatta sitä aikaa, kun eläimet pidetään yhdessä, ja imetysaikaa) ja saadun testiaineen määrä P- ja F1-eläimillä (ravintoon/juomaveteen sekoitettuna)

— absorptiotiedot (jos mitattu)

— P-eläinten painotiedot

— valittujen F_1-eläinten painotiedot vieroituksen jälkeen

— eläinten kuolinaika tutkimusaikana tai eloonjääneet sen päätyttyä

— kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (ovatko kumottavissa vai eivät)

— hematologia, virtsa-analyysi ja kliinisen kemian tiedot, mukaan lukien TSH ja T4

— pernan solujen fenotyypin analyysi (T-, B-, tappajasolut)

— luuytimen solujen määrä

— toksista vastetta koskevat tiedot

— niiden P- ja F_1-naaraiden määrä, joilla on normaali tai epänormaali kiimasykli, ja syklin pituus

— pariutumiseen tarvittava aika (yhdyntää edeltävä väli, parituksen ja pariutumisen välisten päivien määrä)

— toksiset ja muut vaikutukset lisääntymiseen, mukaan lukien lukumäärä ja prosenttiosuus eläimistä jotka parittelevat, tulevat tiineiksi, synnyttävät ja imettävät, uroksista, jotka saavat naaraan tiineeksi, ja naaraista, joilla esiintyy merkkejä synnytyshäiriöstä, pitkittyneestä tai vaikeasta synnytyksestä

— tiineyden kesto ja, jos on tietoja, synnytyksen kesto

— implantaatioiden lukumäärä, poikueiden koko ja urospuolisten pentujen prosenttiosuus

— implantaation jälkeen tapahtuneiden tiineyden keskeytymisten, elävänä syntyneiden ja kuolleena syntyneiden lukumäärä ja prosenttiosuus

— poikueen paino ja poikasen painotiedot (urokset ja naaraat erikseen sekä kummatkin yhdessä), kitukasvuisten eläinten määrä, jos tämä määritellään

— selvästi näkyvistä epämuodostumista kärsivien poikasten lukumäärä

— toksiset tai muut vaikutukset poikasiin, syntymän jälkeiseen kasvuun, elinkykyyn jne.

— tiedot poikasten fyysisistä kehitysvaiheista ja muut syntymän jälkeiseen kehitykseen liittyvät tiedot

— F_1-eläinten sukukypsyyttä koskevat tiedot

— poikasten ja täysikasvuisten toimintoja koskevat havainnot tarvittaessa

— P-eläinten ja täysikasvuisten F_1-eläinten ruumiinpaino lopettamishetkellä sekä elinten absoluuttinen ja suhteellinen paino

— ruumiinavauslöydökset

— tarkka selostus kaikista histopatologisista löydöksistä

— P- ja F_1-sukupolvien urosten lisäkiveksen hännän siittiöiden kokonaismäärä, progressiivisesti liikkuvien siittiöiden prosenttiosuus, morfologisesti normaalien siittiöiden prosenttiosuus ja poikkeavien siittiöiden prosenttiosuus kunkin havaitun poikkeavuuden mukaan

— P- ja F_1-naaraiden munasarjoihin sisältyvien munarakkuloiden määrä ja kypsyysaste tarvittaessa

— F_1-naaraiden munasarjojen keltarauhasten laskenta

— tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Kohortin 2 parametrit:

— yksityiskohtainen kuvaus menettelyistä, joita käytetään standardoimaan havainnot ja menettelyt sekä operatiiviset määritelmät pisteytykseen liittyville havainnoille

— luettelo kaikista käytetyistä testimenettelyistä ja perustelut niiden käytölle

— yksityiskohtaiset tiedot käytetyistä käyttäytymisoireisiin/toimintaan liittyvistä, neuropatologisista ja morfometrisistä menettelyistä mukaan lukien yksityiskohtaiset tiedot automaattilaitteista

— laitteiden kalibrointia ja vastaavuuden varmistamista koskevat menettelyt ja koeryhmien tasapainottaminen testimenettelyissä

— lyhyt perustelu, jossa selvitetään mahdollisia päätöksiä, joihin liittyy asiantuntija-arvio

— yksityiskohtainen kuvaus kaikista käyttäytymisoireisiin/toimintaan liittyvistä, neuropatologisista ja morfometrisistä löydöksistä sukupuolen ja annosryhmän perusteella, mukaan lukien kontrolliryhmiä koskevat lisäykset ja vähennykset

— aivojen paino

— havainnot hermostollisista oireista tai vaurioista mukaan lukien luonnollisesti esiintyvät sairaudet tai tilat

— kuvat esimerkkilöydöksistä

— morfometriassa käytettyjen leikkeiden homologian arviointiin käytetyt vähän tehoa kuluttavat kuvat

— tulosten tilastollinen käsittely, mukaan lukien tietojen analysointiin käytetyt tilastolliset mallit ja tulokset riippumatta siitä, olivatko ne merkittävät

— muiden toksisten vaikutusten yhteys testikemikaalin mahdollisesta neurotoksisuudesta tehtyihin johtopäätöksiin sukupuolen ja annosryhmän perusteella

— toksikokineettisten tietojen vaikutus päätelmiin

— testimenetelmän luotettavuutta ja herkkyyttä tukevat tiedot (kuten positiiviset ja aikaisemmat kontrollitiedot)

— mahdolliset suhteet neuropatologisten ja toiminnallisten vaikutusten välillä

— haitaton tai vertailukohtana oleva annos emoille ja poikasille sukupuolen ja annosryhmän perusteella.

— pohdinta tietojen yleisestä tulkinnasta tulosten perusteella, mukaan lukien johtopäätös siitä, aiheuttiko kemikaali hermostonkehitykseen vaikuttavia myrkyllisyysvaikutuksia, ja haitattomasta vaikutustasosta.

Kohortin 3 parametrit:

— seerumin IgM-vasta-aineiden titteri (herkistys SRBC:lle tai KLH:lle) tai pernan IgM:n PFC-yksiköt (herkistys SRBC:lle)

— T-solujen antigeenin reaktiota (TDAR) koskeva menettely pitäisi vahvistaa osaksi optimointiprosessia laboratoriossa, joka suorittaa testin ensimmäisen kerran, ja se olisi toteutettava säännöllisesti (esimerkiksi vuosittain) kaikissa laboratorioissa

— pohdinta tietojen yleisestä tulkinnasta tulosten perusteella, mukaan lukien johtopäätös siitä, aiheuttiko kemikaali immuunijärjestelmän kehitykseen vaikuttavia myrkyllisyysvaikutuksia, ja haitattomasta vaikutustasosta.

Tulosten pohdinta

Päätelmät, mukaan lukien haitatonta vaikutustasoa koskevat arvot poikasia saaneille täysi-ikäisille ja poikasille aiheutuvista vaikutuksista

Kaikki tiedot, joita ei saatu tutkimuksen aikana mutta jotka ovat hyödyllisiä tulosten tulkintaa varten (kuten vaikutusten yhtäläisyydet joihinkin tunnettuihin neurotoksisiin aineisiin), pitäisi myös esittää.

Tulosten tulkinta

80. Pidennetyssä yhden sukupolven lisääntymistoksisuutta koskevassa tutkimuksessa tarjotaan tarvittaessa tietoja toistuvasta altistumisesta kemikaalille lisääntymissyklin kaikissa vaiheissa. Tutkimuksella tarjotaan erityisesti tietoa poikasten lisääntymiselimistä ja kehityksestä, kasvusta, selviytymisestä sekä toiminnallisista päätetapahtumista syntymän jälkeiseen päivään 90 saakka.

81. Tutkimustulosten tulkinnassa olisi otettava huomioon kaikki saatavilla olevat tiedot kemikaalista, kuten fysikaaliskemialliset, toksikokineettiset ja toksikodynaamiset ominaisuudet, saatavilla olevat asiaankuuluvat tiedot rakenteeltaan vastaavista aineista ja tulokset aikaisemmin tehdyistä myrkyllisyystutkimuksista, joissa on käytetty testikemikaalia (esim. välitön myrkyllisyys, myrkyllisyys toistuvan käsittelyn jälkeen, mekaaniset tutkimukset tai tutkimukset, joissa arvioidaan, liittyykö metabolisiin ominaisuuksiin *in vivo*/*in vitro* huomattavia laadullisia ja määrällisiä lajikohtaisia eroja). Ruumiinavausta ja elinten painoja koskevia tuloksia olisi arvioitava muiden toistuvilla annoksilla tehtyjen tutkimusten yhteydessä, kun tämä on mahdollista Poikasten kasvun hidastumista voidaan tarkastella suhteessa testikemikaalin maidon koostumukselle aiheuttamaan vaikutukseen (29).

Kohortti 2 (hermostonkehitykseen kohdistuva toksisuus)

82. Hermostoperäisiä käyttäytymisoireita koskevia tuloksia olisi tulkittava kaikkien löydösten yhteydessä käyttäen painoarvoanalyysiä ja asiantuntija-arviota. Käytöstä koskevia tai morfologisia löydöksiä, jos niitä on, sekä annosvasteita koskevaa näyttöä olisi käsiteltävä. Tähän olisi sisällyttävä hermostonkehitykseen vaikuttavien myrkyllisyysvaikutuksien arviointi, mukaan lukien ihmisen epidemiologiset tutkimukset tai tapausselostukset ja koe-eläimillä tehdyt tutkimukset (esim. toksikokineettiset tiedot, rakenne-aktiivisuustiedot, tiedot muista toksisuustutkimuksista). Tietojen arviointiin olisi sisällyttävä pohdinta biologisista ja tilastollisesta merkityksestä. Arviointiin pitäisi sisältyä havaittujen neuropatologisten ja käyttäytymiseen liittyvien muutosten välinen mahdollinen suhde. Ohjeita hermostonkehitykseen kohdistuvaa myrkyllisyysvaikutusta koskevien tulosten tulkinnasta esitetään testimenetelmässä B.53 (35) ja lähteessä Tyl et al., 2008 (31).

Kohortti 3 (Immuunijärjestelmän kehitykseen kohdistuva toksisuus)

83. T-soluriippuvaisella vasta-ainevasteella (TDAR) arvioitavaa immuunitoiminnan suppressiota tai tehostumista olisi arvioitava kaikkien tehtyjen havaintojen yhteydessä. TDAR:in tulosten merkitsevyyttä voivat tukea muut vaikutukset immunologisesti samankaltaisiin indikaattoreihin (kuten luuytimen solut, imukudosten paino ja histopatologia, lymforsyyttien alaryhmien jakautuminen). TDAR:in osoittamat vaikutukset voivat olla vähemmän merkitseviä, jos alemmilla altistuspitoisuuksilla todetaan muita haittavaikutuksia.

84. OECD:n ohjeasiakirjaa 43 olisi käytettävä lisääntymiseen ja hermostonkehitykseen kohdistuviin myrkyllisyysvaikutuksiin liittyvien tulosten tulkinnan apuna (26).

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69–98.

(2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530–536.

(3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

(4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87–94.

(5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1–4.

(6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293–327.

(7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356–369.

(8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1–21.

(9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research*, Part B, 68, 408–415.

(10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84–97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology*, 13: 383–390.

(13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298–303.

(14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9–19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23–35.

(16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92–108.

(17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*,54, 103–107.

(18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*,5, 39–44.

(19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237–244.

(20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267–273.

(21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Functio in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409–421.

(22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449–458.

(23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. s. 319–333.

(24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401–415.

(25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491–505.

(26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

(27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', *Journal of Andrology*, 8, 330–337.

(28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296–313.

(29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8–16.

(30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717–1726.

(31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349–381.

(32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

(33) Tämän liitteen B.43 luku, 'Neurotoksisuustutkimus jyrsijöillä'.

(34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(35) Tämän liitteen B.53 luku, 'Hermostonkehitykseen kohdistuvia myrkyllisyysvaikutuksia koskeva tutkimus'.

(36) Tämän liitteen B.54 luku, 'Kohtuun aiheutuvien vaikutuksien biologinen määritysmenetelmä jyrsijöillä: lyhytaikainen seulontatesti estrogeenisista ominaisuuksista'

(37) Tämän liitteen B.55 luku, 'Rotilla tehtävä Hershbergerin biotesti: lyhytaikainen seulontatesti androgeenisista (antiandrogeenisista) ominaisuuksista'

(38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

(39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

(40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

Lisäys 1

Toimenpiteet ja havainnot, jotka sisältyvät toimintaa ja havainnointia koskevaan testiin (Kohortti 2A)

Kotihäkissä ja avoimella kentällä	Käsittely	Fysiologia
Asento	Vaivaton siirtäminen	Lämpötila
Tahattomat kouristusliikkeet ja jäykkyys	Vaivaton käsittely	Ruumiinpaino
Luomen sulkeutuminen	Lihaskunto	Pupillien vaste
Karvojen jäykistyminen	Lähestymiseen liittyvä vaste	Pupillien koko
Syljeneritys	Kosketusvaste	
Kyyneleet	Kuulovaste	
Äänteley	Hännänpuristusvaste	
Tukeminen pystyyn	Suoristusvaste	
Epätavallinen käynti	Käpälän leviäminen pudotessa	
Herätysreaktio	Eturaajan puristusvoima	
Kaavamainen liike	Takaraajan puristusvoima	
Omituinen käyttäytyminen		
Laikut		
Epätavallinen hengitys		

Lisäys 2

MÄÄRITELMÄT:

Kemikaali: aine tai aineiden seos.

Testikemikaali: mikä tahansa aine tai seos, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää.

B.57. **H295R-STEROIDOGENEESIÄ KOSKEVA TESTI**

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 456 (2011). OECD aloitti vuonna 1998 korkean prioriteetin toimenpiteet, jotta voimassa olevia testiohjeita tarkistetaan ja jotta kehitetään uusia ohjeita, joilla mahdollisia hormonaalisia haitta-aiheita seulotaan ja testataan. Vuonna 2002 annettuihin hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskeviin OECD:n käsitteellisiin puitteisiin (OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) sisältyy viisi tasoa, joista kukin vastaa biologisen monimuotoisuuden eri tasoa (1). Tässä testimenettelyssä kuvatussa H295R-steroidogeneesiä koskevassa testissä *in vitro*, jäljempänä 'H295R-testi', käytetään ihmisen adreno-karsinooma-solulinjaa (NCI-H295R-soluja). Kyseessä on tason 2 *in vitro* -testi, jolla tarjotaan mekanistisia tietoja, joita käytetään seulontaa ja etusijajärjestystä varten. Testin kehittäminen ja standardointi steroidogeneesin kemiallisten vaikutusten seurantaan, erityisesti 17-beeta-estradiolin, jäljempänä 'E2', ja testosteronin, jäljempänä 'T', tuotannon osalta, toteutettiin monivaiheisessa prosessissa. H295R-testiä on optimoitu ja se on validoitu (2)(3)(4)(5).

2. H295R-testin tavoitteena on havaita kemikaalit, jotka vaikuttavat E2:n ja T:n tuotantoon. H295R-testillä on tarkoitus tunnistaa vierasaineet, joiden kohteena ovat ne endogeeniset komponentit, jotka muodostavat solunsisäisen biokemiallisen reitin, joka alkaa reaktiosarjalla kolesterolista E2:n ja/tai T:n tuottamiseen. H295R-testillä ei ole tarkoitus tunnistaa kemikaaleja, jotka vaikuttavat steroidogeneesiin hypotalamusta, aivolisäkettä ja sukupuolirauhasia koskevan akselin (HPG-akseli) vaikutusten vuoksi. Testin tavoitteena on antaa vastaukseksi KYLLÄ tai EI siihen, voiko kemikaali aiheuttaa tai estää T:n ja E2:n tuotannon. Joissain tapauksissa voidaan kuitenkin saada kvantitatiivisia tuloksia (ks. 53 ja 54 kohta) Testin tulokset ilmaistaan suhteellisina muutoksina hormonituotantoon liuotinkontrolleihin verrattuna. Testillä ei pyritä tarjoamaan erityistä mekanistista tietoa testikemikaalin vuorovaikutuksesta umpierityspalautejärjestelmän kanssa. On tehty tutkimuksia, joissa solulinjoja käytetään havaitsemaan vaikutuksia tiettyihin entsyymeihin ja reaktion välituotteina oleviin hormoneihin, kuten progesteroniin (2).

3. Tässä testimenetelmässä käytetyt määritelmät ja lyhenteet määritellään liitteessä. Yksityiskohtainen testiprotokolla, johon sisältyvät tiedot siitä, miten valmistetaan liuoksia, viljellään soluja ja toteutetaan testin eri aspekteja, on saatavilla OECD:n asiakirjassa 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' olevassa liitteessä I–III (4).

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT JA RAJOITUKSET

4. Sukupuolisteroidihormonien biosynteesiin liittyy viisi erilaista entsyymiä, jotka katalysoivat kuusi erilaista reaktiota. Kolesterolin entsymaattinen muuntaminen pregnonoloniksi sytokromin P450 (CYP) kolesterolin sivuketjun pilkkovalla entsyymillä (CYP11A) muodostaa ensimmäisen vaiheen sarjassa biokemiallisia reaktioita, jotka johtavat steroidien lopputuotteiden synteesiin. Seuraavan kahden reaktion järjestyksestä riippuen steroidogeeninen reitti jakaantuu kahteen reittiin, Δ^5-hydroksisteroidi-reittiin ja Δ^4-ketosteroidi-reittiin, jotka lähenevät toisiaan androsteenidionin tuottamiseksi (kuva 1).

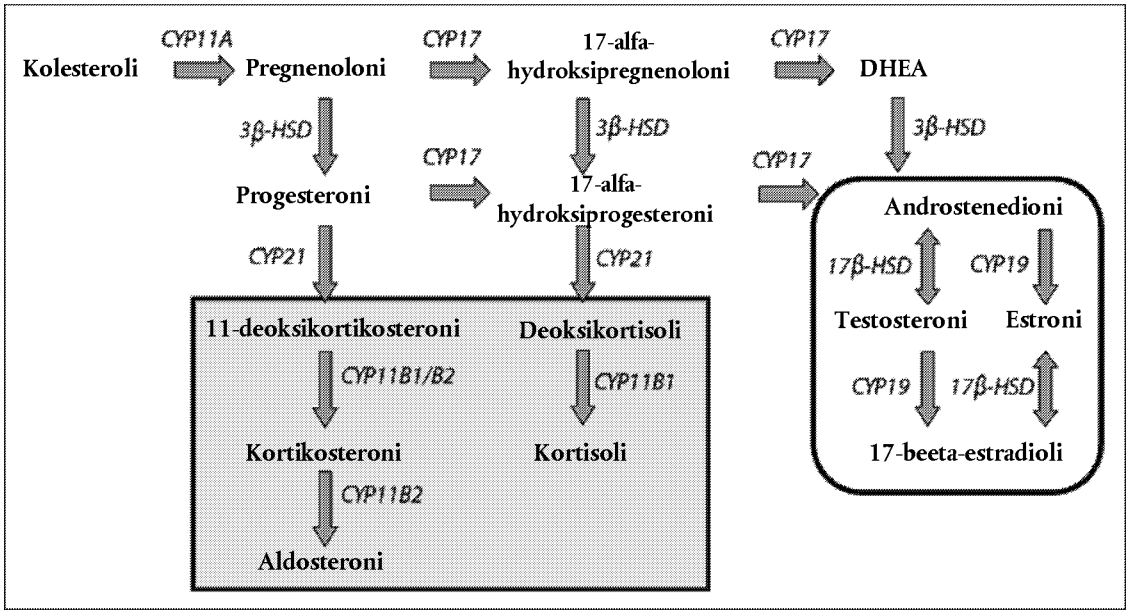
5. Androstenedioni muunnetaan testosteroniksi 17β-hydroksisteroididehydrogenaasin välityksellä (17β-HSD). Testosteroni on reaktion välituotteena oleva hormoni ja lopputuote. Urosten osalta T voidaan muuntaa dihydrotestosteroniksi, jäljempänä 'DHT', 5-alfareduktaasilla. Sitä on solukalvoissa, tumakotelossa ja androgeenien kohdekudosten, kuten eturauhasen ja rakkularauhasten endoplasmakalvostoissa. DHT on huomattavasti vahvempi androgeeni kuin T ja sitä pidetään lopputuotteena olevana hormonina. H295R-testissä ei mitata DHT:tä (ks. 10 kohta).

6. Steroidogeenisen reitin entsyymi on aromataasi, jäljempänä 'CYP19'. Se muuntaa kemikaalit, joilla on androgeenivaikutus, kemikaaleiksi, joilla on estrogeenivaikutus. CYP19 muuntaa T:n 17β-estradioliksi (E2) ja androstenedionin estroniksi. E2:ta ja T:tä pidetään steroidogeneesin lopputuotteina.

7. CYP17:n lyaasiaktiivisuuden spesifiys eroaa substraattina toimivien välituotteiden osalta lajien välillä. Ihmisellä entsyymi suosii Δ^5-hydroksisteroidi-reitin substraatteja, kuten pregnenoloni, ja rotilla Δ^4-ketosteroidi-reitin substraatteja, kuten progesteroni (19). Tällaiset erot CYP17:n lyaasiaktiivisuudessa voivat selittää eräät lajiriippuvaiset erot reaktiossa kemikaaleihin, jotka muuttavat steroidogeneesiä *in vivo* -olosuhteissa (6). H295-solujen on osoitettu vastaavan parhaiten aikuisen ihmisen lisämunaisen entsyymin ilmentymistä ja steroidituotannon kaavaa (20), mutta niiden tiedetään ilmentävän entsyymejä sekä Δ^5-hydroksisteroidi-reitillä että Δ^4-ketosteroidi-reitillä androgeenisynteesiä varten (7)(11)(13)(15).

Kuva 1

Streoidogeeninen reitti H295R-soluissa



Huom.
Entsyymit on kirjoitettu kursiivilla, hormonit on lihavoitu ja nuolet osoittavat synteesin suunnan. Harmaa tausta osoittaa kortikosteroidin reitit/tuotteet. Sukupuolisteroidireitit/tuotteet on ympyröity. CYP = sytokromi P450; HSD = hydroksisteroididehydrogenaasi; DHEA = dehydroepiandrosteroni.

8. Ihmisen adreno-karsinooma-solulinja on hyödyllinen *in vitro* -malli, jolla selvitetään steroidihormonien synteesin vaikutuksia (2)(7)(8)(9)(10). H295R-solulinja ilmentää geenejä, jotka koodaavat kaikkia steroidogeneesin pääasiallisia entsyymejä, jotka on esitetty edellä (11)(15) (kuva 1). Tämä on ainutlaatuista, koska näiden geenien *in vivo* ilmiasu on kudos, ja se on kehitysvaihespesifinen, ja tavallisesti yhdessäkään kudoksessa tai kehitysvaiheessa ei ilmene kaikkia steroidogeneesiin osallistuvia geenejä (2). H295R-soluilla on ihmisen sikiön erilaistumattomien lisämunuaissolujen fysiologiset ominaisuudet (11). Nämä solut ovat ainutlaatuinen *in vitro* -järjestelmä, koska niillä on mahdollista tuottaa kaikkia aikuisen lisämunuaisten kuoressa ja sukurauhasissa olevia steroidihormoneja. Niillä voidaan siten testata vaikutuksia kumpaankin kortikosteroidin synteesiin ja sukupuolisteroidihormonien, kuten androgeenien ja estrogeenien tuotantoon, vaikka testi validoitiin ainoastaan T:n ja E2:n havainnointia varten. Testijärjestelmässä kirjatut muutokset, jotka liittyvät T:n ja E2:n tuotannon muutoksiin, voivat olla tulos testikemikaalien hyvin erilaisista vuorovaikutuksista steroidogeenisten toimintojen kanssa, joita ilmentävät H295-solut. Näihin sisältyvät steroidihormonien tuotantoon, muuntamiseen tai poistamiseen osallistuvien entsyymien ilmentymisen, synteesin tai toiminnan modulointi (12)(13)(14). Hormonituotannon inhibitio voi johtua suorasta kompetitiivisesta sitoutumisesta entsyymiin reitillä, kofaktoreiden, kuten NADPH:n (nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti) ja cAMP:in (syklinen adenosiinimonofosfaatti) vaikutuksesta ja/tai steroidiaineenvaihdunnan lisääntymisestä taikka tiettyjen entsyymien geenien ilmentymisen vaimenemisesta steroidogeneesiä koskevalla reitillä. Vaikka inhibitio voi olla hormonituotannon suoraan ja epäsuoraan prosesseihin liittyvä toiminta, induktio liittyy siihen tyypillisesti epäsuorasti, eli se vaikuttaa kofaktoreiden, kuten NADPH:n ja cAMP:n välityksellä (kuten forskoliinin tapauksessa), steroidiaineenvaihduntaa alentamalla (13) ja/tai se voi johtaa steroidogeenisen geenin ilmentymän ylössäätymiseen.

9. H295R-testillä on useita etuja:

— sillä voidaan havaita T:n ja E2:n tuotannon lisääntyminen ja vähentyminen

— sen perusteella voidaan arvioida suoraan kemikaalin mahdollista vaikutusta solujen elinkykyyn/sytotoksisuuteen. Tämä on tärkeä seikka, koska tällä voidaan todeta ero sytotokisuudesta johtuvien vaikutusten ja niiden vaikutusten välillä, jotka johtuvat suorasta vuorovaikutuksesta kemikaaleihin, joilla on steroidogeeninen reitti. Tämä ei ole mahdollista kudosten eksplanttien järjestelmissä, jotka koostuvat useista solutyypeistä, joiden herkkyys ja toiminta vaihtelevat

— se ei edellytä eläinten käyttöä

— H295R-solulinja on saatavissa kaupallisesti.

10. Testin pääasialliset rajoitukset ovat seuraavat:

— sen metabolointikyky on tuntematon, mutta se on luultavasti melko rajallinen; tästä syystä kemikaalit, jotka edellyttävät metabolista aktivointia, jätetään todennäköisesti pois tästä testistä

— koska H295R on peräisin lisämunuaisen kudoksesta, siinä on entsyymejä, jotka voivat tuottaa gluko- ja mineraalikortikoideja sekä sukupuolihormoneja; tästä syystä gluko- ja mineraalikortikoiden tuotannon vaikutus voi vaikuttaa testissä havaittavaan T:n ja E2:n tasoon

— sillä ei mitata DHT:tä ja tästä syystä ei oleteta, että sillä havaitaan kemikaaleja, jotka estävät 5-alfa-reduktaasin, missä tapauksessa voidaan käyttää Hershbergerin testiä (16)

— H295R-testillä ei tunnisteta kemikaaleja, jotka häiritsevät steroidogeneesiä vaikuttamalla hypotalamusta, aivolisäkettä ja sukupuolirauhasia koskevaan akseliin (HPG-akseli), koska tätä voidaan tutkia ainoastaan leikkaamattomilla eläimillä.

TESTIN PERIAATE

11. Testin tarkoituksena on havaita kemikaalit, jotka vaikuttavat T:n ja E2:n tuotantoon. Testosteroni on myös reaktion välituote E2:n tuotantoreitillä. Tällä testillä voidaan havaita kemikaalit, jotka yleensä inhiboivat tai indusoivat stereidogeneesin reitin entsyymejä.

12. Testi tehdään yleensä vakiomuotoisissa soluviljelyolosuhteissa käyttämällä 24-kuoppalevyjä. Testin suorittamiseen voidaan käyttää vaihtoehtoisesti muita levykokoja; istutusta ja koeolosuhteita olisi kuitenkin vastaavasti mukautettava, jotta suorituskriteereitä noudatetaan.

13. Soluja sopeutetaan monikuoppalevyillä 24 tunnin ajan, jonka jälkeen ne altistetaan 48 tunnin ajan testikemikaalin seitsemälle pitoisuudelle ainakin kolmena näytekappaleena. Liuotinta sekä hormonituotannon tunnettua inhibiittoria ja indusoijaa käytetään vakiokonsentraatiossa negatiivisena ja positiivisena kontrollina. Altistusjakson jälkeen kasvatusliuos poistetaan kustakin kuopasta. Kunkin kuopan solujen elinkykyä analysoidaan välittömästi kasvatusliuoksen poistamisen jälkeen. Hormonipitoisuus kasvatusliuoksessa voidaan mitata käyttäen erilaisia menetelmiä, kuten kaupallisesti saatavilla olevia hormonimittaussarjoja ja/tai instrumenttitekniikoita, kuten nestekromatografiaa-massaspektrometriaa (LC-MS). Tiedot ilmaistaan kerrannaismuutoksena suhteessa liuotinkontrolliin ja alhaisimman havaittavan vaikutuksen aiheuttavaan pitoisuuteen (LOEC). Jos testi on negatiivinen, korkein testattu pitoisuus ilmoitetaan pitoisuutena, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta (NOEC). Päätelmän siitä, vaikuttaako kemikaali steroidogeneesiin, olisi perustuttava vähintään kahteen toisistaan riippumattomaan testiin. Ensimmäinen testi voi olla haarukointitesti, jonka jälkeen pitoisuuksia mukautetaan tarvittaessa toista ja kolmatta testiajoa varten, jos havaitaan liukoisuutta tai sytotoksisuutta koskevia ongelmia tai jos kemikaalin aktiivisuus vaikuttaa olevan testattavien pitoisuuksien sarjan loppupäässä.

VILJELMÄÄ KOSKEVA MENETTELY

Solulinja

14. NCI-H295R-solut ovat kaupallisesti saatavilla American Type Culture Collections -organisaatiolta (ATCC) materiaalin siirtosopimuksen allekirjoittamisen jälkeen ([1]).

Johdanto

15. Koska E2:n kapasiteetti tuottaa soluja muuttuu iän/pasaasien myötä (2), solut olisi viljeltävä erityisen menetelmän perusteella, ennen kuin niitä käytetään. Samalla olisi kirjattava pasaasinumero (jakamiskertojen määrä), sen jälkeen kun solut sulatetaan, sekä pasaasinumero, jolloin solut pakastettiin ja säilöttiin nestemäiseen typpeen. Ensimmäinen numero osoittaa todellisen solun pasaasin numeron ja toinen numero sen pasaasin numeron, jolloin solut pakastettiin ja säilöttiin. Esimerkiksi solut, jotka pakastettiin pasaasin viisi jälkeen ja sulatettiin ja jaettiin sen jälkeen kolme kertaa (4 jakamiskertaa, jolloin juuri sulatetut solut lasketaan jakamiskerraksi 1), ennen kuin ne viljeltiin uudelleen, merkittäisiin pasaasinumerolla 4.5. Numerointijärjestelmää koskeva esimerkki sisältyy validointiraportin liitteeseen I (4).

16. Kasvatusliuoksen kantaliuosta käytetään pohjana lopulliselle kasvatusliuokselle ja pakastusliuokselle. Lopullinen kasvatusliuos on tarpeellinen komponentti solujen viljelyssä. Pakastusliuos on suunniteltu niin, että solut voidaan

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, Yhdysvallat [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

pakastaa ilman, että niille aiheutuu vaikutuksia pitkän aikavälin varastoinnista. Seeruminkorviketta (Nu-serum) (tai vastaavaa seerumia, jolla on samanlaiset ominaisuudet ja jonka on osoitettu tuottavan tietoa, joka on testin suoritusta ja laadunvalvontaa koskevien edellytysten mukainen), joka on lopullisen kasvatusliuoksen ainesosa, olisi analysoitava ennen käyttöä T:n ja E2:n taustapitoisuuksien osalta. Näiden liuosten valmistusta kuvataan validointiraportin liitteessä II (4).

17. Sen jälkeen, kun alkuperäisen ATCC-sarjan H295R-soluviljelmä otetaan käyttöön, soluja olisi kasvatettava viiden pasaasin ajan (eli solut jaetaan neljä kertaa). Pasaasin viisi solut pakastetaan nestemäiseen typpeen varastointia varten. Ennen kuin solut pakastetaan, näyte edellisen pasaasin 4 soluista tehdään laadunvalvontalevyllä (ks. 36 ja 37 kohta), jotta varmistetaan, täyttävätkö hormonien perustuotanto ja positiivisen kontrollin kemikaalien vaste taulukossa 5 määritellyt testin laadunvalvontakriteerit.

18. H295R-solut on viljeltävä, pakastettava ja säilytettävä nestemäisessä typessä, jotta varmistetaan, että viljelyä ja käyttöä varten on aina pasaasiltaan ja iältään asianmukaisia soluja. Pasaasien enimmäismäärä sen jälkeen, kun viljelyyn on otettua uusien ([1]) tai pakastettujen ([2]) solujen erä, jonka käyttö H295R-testissä on hyväksyttävää, ei saisi ylittää 10 kertaa. Esimerkiksi hyväksyttävä jakamiskerta pakastetusta erästä peräisin olevien solujen viljelmälle jakamiskerralla 5 olisi 4.5 aina jakamiskertaan 10.5 saakka. Näistä pakastetuista eristä kasvatettavien solujen osalta olisi noudatettava 19 kohdassa kuvattua menetelmää. Nämä solut olisi viljeltävä vielä ainakin neljän (4) pasaasin ajan (pasaasinumero 4.5), ennen kuin niitä käytetään testaukseen.

Pakastetusta varastosta peräisin olevat kasvatettavat solut

19. Pakastetusta erästä kasvatettavia soluja koskevaa menettelyä käytetään, kun uusi erä soluja poistetaan nestemäisen typen varastosta viljelyä ja testausta varten. Tämän menettelyn yksityiskohtia kuvataan validointiraportin liitteessä III (4). Solut siirretään nestemäisen typen varastosta, ne sulatetaan nopeasti, sijoitetaan sentrifugiputkeen lopulliseen kasvatusliuokseen, sentrifugoidaan huoneenlämmössä, suspensoidaan jälleen lopulliseen kasvatusliuokseen ja siirretään soluviljelypulloon. Kasvatusliuos pitäisi vaihtaa seuraavana päivänä. H295R-soluja kasvatetaan inkubaattorissa 37 °C:ssa ja ilman seoksessa johon sisältyy 5 % CO_2:ta normaali-ilmanpaineessa. Kasvatusliuos vaihdetaan 2–3 kertaa viikossa. Kun solujen konfluenssi on noin 85–90 %, niiden pitäisi jakautua. Solujen jakaminen on tarpeen, jotta solujen terveys ja kasvu varmistetaan ja jotta niitä ylläpidetään biotestien suorittamista varten. Solut huuhdellaan kolme kertaa fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS, ilman Ca^{2+} Mg^{2+}) ja irrotetaan soluviljelypullosta lisäämällä asianmukaista irrottamiseen tarkoitettua entsyymiä, esimerkiksi trypsiiniä, PBS:ään (ilman
Ca^{2+} Mg^{2+}). Välittömästi sen jälkeen kun solut irtoavat soluviljelypullosta, entsyymien toiminta olisi päätettävä lisäämällä lopullista kasvatusliuosta suhteessa 3 × entsyymikäsittelyyn käytetty tilavuus. Solut sijoitetaan sentrifugiputkeen, sentrifugoidaan huoneenlämmössä, supernatantti poistetaan ja solupelletti resuspensoidaan lopulliseen kasvatusliuokseen. Asianmukainen määrä soluliuosta sijoitetaan uuteen soluviljelypulloon. Soluliuoksen määrää olisi mukautettava, jotta solut ovat konfluentteja 5–7 päivän kuluessa. Suositeltu jatkoviljelmien suhde on 1:3–1:4. Levy olisi merkittävä huolellisesti. Soluja voidaan sen jälkeen käyttää testissä ja ylimääräiset solut voidaan pakastaa nestemäiseen typpeen 20 kohdassa tarkoitetulla tavalla.

H295R-solujen pakastaminen (solujen valmistelu nestemäiseen typpeen varastointia varten)

20. H295R-solujen pakastamisen valmistelemiseksi olisi noudatettava edellä esitettyä solujen jakamista koskevaa menettelyä siihen vaiheeseen saakka, että solupelletti resuspendoidaan sentrifugiputken pohjaan. Tämän jälkeen solupelletti resuspendoidaan pakastusliuokseen. Liuos siirretään kryogeeniseen pulloon, se merkitään asianmukaisesti ja jäädytetään – 80 °C:een 24 tunniksi, jonka jälkeen kryogeeninen pullo siirretään nestemäiseen typpiin varastointia varten. Tämän menettelyn yksityiskohtia kuvataan validointiraportin liitteessä III (4).

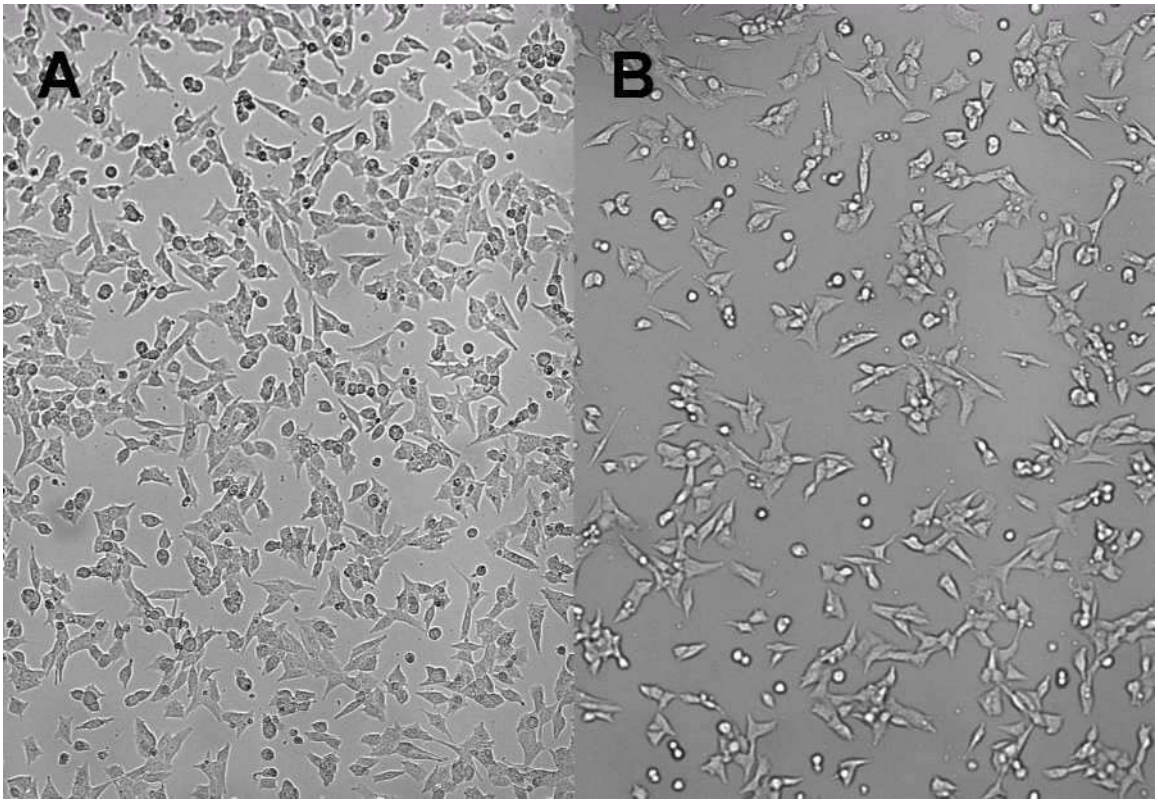
Levyt ja solujen esi-inkubointi

21. Edellä 19 kohdassa tarkoitetulla tavalla käsiteltyjen 24-kuoppalevyjen tarvittava määrä riippuu testattavien kemikaalien määrästä ja viljelyyn käytettyihin astioihin sisältyvien solujen konfluenssista. Pääsääntöisesti yksi soluviljelypullo (75 cm^2) soluja, joiden konfluenssi on 80–90 %, tuottaa tarpeeksi soluja yhdestä puolelletoista levylle (24-kuoppalevy), ja tavoitetiheys on 200 000–300 000 solua millilitrassa, mikä johtaa arviolta 50–60 % konfluenssiin kuopissa 24 tunnin viljelyn aikana (kuva 2). Tämä on tyypillisesti optimaalinen solutiheys hormonin tuottamiseksi testissä. Korkeammilla tiheysasteilla T:n ja E2:n tuotantotapaa muutetaan. Ennen kuin testi tehdään ensimmäisen kerran, suositellaan, että erilaisia istutustiheyksiä (200 000–300 000 solua millilitraa kohti) testataan ja että näin kuopissa 24 tunnin viljelyn aikana aikaansaatu 50–60 % konfluenssi valitaan lisäkokeita varten.

([1]) Uudella erällä tarkoitetaan ATCC:lta vastaanotettua uutta soluerää.
([2]) Pakastetulla erällä tarkoitetaan soluja, joita on viljelty aikaisemmin ja joita on sen jälkeen pakastettu laboratoriossa, joka ei ole ATCC.

Kuva 2

Mikrovalokuva H295R-soluista istutustiheydellä 50 % 24-kuoppalevyllä 24 tunnin viljelyn jälkeen otettuna kuopan laidalta (A) ja keskeltä (B)



22. Kasvatusliuos poistetaan pipetillä soluviljelypullosta ja solut huuhdellaan 3 kertaa steriilillä PBS:llä (ilman $Ca^{2+}Mg^{2+}$). Entsyymiliuosta (joka on sekoitettu PBS:ään) lisätään, jotta solut irtoavat soluviljelypullosta. Sopivan ajan kuluttua siitä, kun solut irtoavat, entsyymien toiminta olisi päätettävä lisäämällä lopullista kasvatusliuosta suhteessa 3 × entsyymikäsittelyyn käytetty tilavuus. Solut sijoitetaan sentrifugiputkeen, sentrifugoidaan huoneenlämmössä, supernatantti poistetaan ja solupelletti suspensoidaan jälleen lopulliseen kasvatusliuokseen. Solutiheys lasketaan käyttäen esimerkiksi hemosytometriä tai solulaskijaa. Soluliuosta olisi laimennettava haluttuun levytiheyteen ja sekoitettava huolellisesti, jotta homogeeninen solutiheys varmistetaan. Solut päällystetään 1 millilitralla soluliuosta kuoppaa kohti, ja levyt ja kuopat merkitään. Istutetut levyt inkuboidaan 37 °C:ssa ja ilman seoksessa, johon sisältyy 5 % CO_2:ta normaali-ilmanpaineessa, 24 tunnin ajan, jotta solut voivat kiinnittyä kuoppiin.

LAADUVALVONTAA KOSKEVAT EDELLYTYKSET

23. On tärkeää, että kuoppiin asetetaan annostuksen aikana liuoksia ja näytteitä tarkka määrä, koska nämä määrät määrittävät pitoisuudet, joita käytetään testitulosten laskennassa.

24. Kunkin laboratorion olisi osoitettava hormonimittausjärjestelmänsä herkkyys ennen soluviljelmän aloittamista ja sitä seuraavia testejä (29–31 kohta).

25. Jos käytetään vasta-aineisiin perustuvia hormonin mittaustestejä, testattavia kemikaaleja olisi analysoitava sen perusteella, mikä on niiden potentiaali häiritä T:n ja E2:n määrän selvittämiseen käytettävää mittausjärjestelmää (siten kuin se esitetään 32 kohdassa) ennen testauksen aloittamista.

26. Testiliuottimeksi suositellaan DMSO:ta. Jos käytetään muuta liuotinta, olisi määriteltävä seuraava:

— testikemikaalin, forskoliinin ja prokloratsin liukoisuus liuottimessa, ja

— sytotoksisuus liuottimen pitoisuuden funktiona.

On suositeltavaa, että suurinta sallittua liuottimen pitoisuutta ei ylitetä niin, että se on laimennusaineena olevan vähiten sytotoksisen liuottimen pitoisuutta yli kymmenen kertaa suurempi.

27. Ennen kuin testi tehdään ensimmäisen kerran, laboratorion olisi tehtävä soveltuvuutta koskeva koe, jossa osoitetaan, että laboratorio pystyy ylläpitämään ja luomaan asianmukaisen soluviljelmän ja testiolosuhteet, joita edellytetään 33–35 kohdassa tarkoitettua kemikaalin testausta varten.

28. Kun testi aloitetaan käyttäen uutta erää, ennen uuden solujen erän käyttämistä olisi käytettävä apuna kontrollikuoppalevyä, jolla arvioidaan solujen tehokkuutta, kuten kuvataan 36 ja 37 kohdassa.

Hormonien mittausjärjestelmän tehokkuus

Menetelmän herkkyys, tarkkuus, täsmällisyys ja ristireaktiivisuus näytematriisin kanssa

29. Kukin laboratorio voi käyttää valitsemaansa hormonien mittausjärjestelmää analysoimaan H295R-solujen tuottamaa T:tä ja E2:ta niin kauan, kuin se täyttää suorituskykyä koskevat kriteerit, kuten määritysrajan. Nämä ovat tavanomaisesti T:n osalta 100 pg/ml ja E2:n osalta 10 pg/ml, ja ne perustuvat validointitutkimuksissa havaittuihin hormonin perustasoihin. Kuitenkin korkeammat tai alemmat tasot voivat olla asianmukaisia riippuen testin suorittavan laboratorioiden saavuttamista hormonien perustasoista. Ennen kuin laadunvalvontalevy tutkitaan ja testiajot suoritetaan, laboratorion olisi osoitettava, että käytettävällä hormonitestillä voidaan mitata hormonien pitoisuuksia lopullisessa kasvatusliuoksessa tarpeeksi tarkasti ja täsmällisesti siten, että testi täyttää taulukossa 1 ja 5 eritellyt laadunvalvontakriteerit, ja se analysoi kasvatusliuosta, johon on lisätty kontrollihormoni. Lopulliseen kasvatusliuokseen lisätään ainakin kolme pitoisuutta kustakin hormonista (eli 100, 500 ja 2 500 pg/ml testosteronia; 10, 50 ja 250 pg/ml E2:ta; tai alhaisimpia mahdollisia pitoisuuksia, jotka perustuvat valitun hormonin mittausjärjestelmän havaitsemisrajoihin, voidaan käyttää T:n ja E2:n alhaisimpia lisättäviä pitoisuuksia varten) ja ne analysoidaan. Näytteiden, joita ei ole uutettu, mitattujen hormonipitoisuuksien olisi oltava alle 30 % nimellisistä pitoisuuksista, ja vaihtelu saman näytteen toisten mittauksien osalta ei saisi ylittää 25:tä prosenttia (ks. myös taulukko 8 täydentävistä laadunvalvontakriteereistä). Jos nämä laadunvalvontakriteerit täytetään, oletetaan, että valittu hormonien mittausta koskeva testi on riittävän tarkka, täsmällinen ja että se ei reagoi ristiin viljelynesteen komponenttien (näytematriisi) kanssa niin, että voidaan olettaa, että sillä vaikutetaan merkittävästi kokeen tulokseen. Tässä tapauksessa näytteitä ei tarvitse uuttaa ennen hormonien mittausta.

30. Jos taulukoissa 1 ja 8 olevat laadunvalvontakriteerit eivät täyty, voi esiintyä merkittävää matriisivaikutusta, ja olisi tehtävä koe uutetulla kasvatusliuoksella, johon on lisätty kontrollihormoni. Uuttamista koskevaan menettelyyn liittyvä esimerkki sisältyy validointiraportin liitteeseen II (4). Uutettujen näytteiden hormonipitoisuuksien mittauksia olisi tehtävä kolme ([1]). Jos voidaan osoittaa, että kasvatusliuoksen komponentit eivät häiritse uuttamisen jälkeen hormonien havaitsemista koskevaa menettelyä, joka määritellään laadunvalvontakriteereissä, kaikki muut kokeet olisi tehtävä käyttäen uutettuja näytteitä. Jos laadunvalvontakriteerejä ei voida täyttää uuttamisen jälkeen, käytetty hormonien mittausjärjestelmä ei sovellu H295R-testin tavoitteita varten. Tässä tapauksessa olisi käytettävä toista hormonien havaitsemista koskevaa menettelyä.

Standardikäyrä

31. Liuotinkontrollin hormonipitoisuuksien olisi oltava standardikäyrän lineaarisen mittausalueen puitteissa. Liuotinkontrollin arvojen pitäisi olla mieluummin lineaarisen mittausalueen keskiosassa, jotta varmistetaan, että hormonisynteesin induktio ja inhibitio voidaan mitata. Mitattavat kasvatusliuoksen laimennokset (tai uutokset) valitaan tämän mukaisesti. Lineaarinen suhde määritellään sopivalla tilastollisella lähestymistavalla.

Kemikaalin interferenssiä koskeva testi

32. Jos vasta-aineisiin perustuvia testejä, kuten entsyymivälitteisiä immunosorbenttimäärityksiä (ELISA-testit) ja radioimmunoanalyysejä käytetään mittaamaan hormoneja, kutakin kemikaalia olisi testattava sen osalta, häiritseekö se mahdollisesti hormonin mittausjärjestelmää, jota käytetään, ennen kuin varsinainen kemikaalien testaus aloitetaan (validointiraportin lisäys III (4)), koska jotkut kemikaalit voivat häiritä näitä testejä (17). Jos esiintyy interferenssiä, jonka vaikutus testosteronin ja/tai E2:n hormonin perustuotannon osalta on ≥ 20 %, kaikkien testikemikaalien kantaliuoksen laimennoksista olisi tehtävä testi, jossa arvioidaan, häiritseekö kemikaali hormonituotantoa (Chemical Hormone Assay Interference Test) (kuten testi, jota kuvataan validointiraportin liitteessä III (4) olevassa

([1]) *Huom.* Jos edellytetään ekstratktiota, kutakin ekstraktiota varten tehdään kolme rinnakkaista mittausta. Kukin näyte otetaan vain kerran.

5.0 kohdassa), ja tunnistettava raja-annos, joka aiheuttaa merkittävän interferenssin (≥ 20 %). Jos interferenssi on alle 30 %, tuloksia voidaan korjata interferenssin osalta. Jos se on yli 30 %, tiedot eivät ole päteviä, ja näitä pitoisuuksia koskevat tiedot on hylättävä. Jos testikemikaali aiheuttaa merkittävää interferenssiä hormonimittausjärjestelmässä enemmän kuin yhdessä ei-sytotoksisessa pitoisuudessa, olisi käytettävä erilaista hormonimittausjärjestelmää. Jotta kemikaaliepäpuhtauksien aiheuttama interferenssi vältetään, suositellaan, että hormonit uutetaan kasvatusliuoksesta sopivaa liuotinta käyttäen. Validointiraportissa esitetään mahdollisia menetelmiä (4).

Taulukko 1

Hormonien mittausjärjestelmien suorituskriteerit

Parametri	Kriteeri
Mittausmenetelmän herkkyys	Määritysraja T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml [a]
Hormonien uuttamistehokkuus (ainoastaan silloin, kun uuttamista tarvitaan)	Keskimääräinen talteenotto (perustuen kolmen näytekappaleen toimenpiteisiin) hormonimäärien, johon on lisätty ainetta, osalta ei saisi poiketa yli 30:tä % määrästä, joka lisättiin.
Kemikaalien aiheuttama interferenssi (ainoastaan vasta-aineisiin perustuvat järjestelmät)	Ei merkittävää (≥ 30 % kyseisen hormonin perustuotannosta) ristireaktiivisuutta minkään solujen tuottaman hormonin kanssa [b] [c]

[a] *Huom.* Mittausmenetelmän rajat perustuvat taulukossa 5 annetun hormonin perustuotannon arvoihin ja ne ovat tulosperusteiset. Jos voidaan saada aikaan laajempi hormonin perustuotanto, raja voi olla laajempi.

[b] Jotkut T:n vasta-aineet voivat reagoida ristiin androstendionin ja E2:n vasta-aineet estronin kanssa, jolloin prosenttiosuus on suurempi. Tällaisissa tapauksissa ei ole mahdollista määrittää tarkasti vaikutuksia 17β-hydroksisteroididehydrogenaasille. Näillä tiedoilla voidaan kuitenkin tarjota hyödyllistä tietoa estrogeenin ja androgeenin tuotannon vaikutuksista yleensä. Tällaisissa tapauksissa tiedot olisi ilmaistava androgeenivasteena tai estrogeenivasteena E2:n ja T:n sijasta.

[c] Näihin sisältyvät: kolesteroli, pregnenoloni, progesteroni, 11-deoksikortikosteroni, kortikosteroni, aldosteroni, 17-alfa-pregnenoloni, 17-alfa-progesteroni, deoksikortisoli, kortisoli, DHEA, androsteenidioni, estroni.

Laboratorion pätevyyttä koskeva testi

33. Laboratorion olisi osoitettava ennen tuntemattomien kemikaalien testausta, että se voi luoda ja ylläpitää asianmukaista soluviljelmää ja testiolosuhteita, joita tarvitaan testin onnistuneeseen suorittamiseen, tekemällä laboratorion pätevyyttä koskevan testin. Koska testin suorittaminen liittyy suoraan testin suorittavan laboratorion henkilöstöön, näitä menettelyjä olisi toistettava osittain, jos laboratorion henkilöstössä tapahtuu muutoksia.

34. Tämä pätevyyttä mittaava testi suoritetaan samoissa olosuhteissa, jotka on esitetty 38–40 kohdassa, niin että solut altistetaan seitsemälle kasvavalle pitoisuudelle voimakkaita, kohtalaisen voimakkaita ja heikkoja induktoreja ja inhibiittoreita sekä negatiiviselle kemikaalille (ks. taulukko 2). Testattaviin kemikaaleihin sisältyvät erityisesti voimakas induktori forskoliini (CAS-nro 66575-29-9); voimakas inhibiittori prokloratsi (CAS-nro 67747-09-5) kohtalaisen voimakas induktori atratsiini (CAS-nro 1912-24-9) kohtalaisen voimakas inhibiittori aminoglutetimidi (CAS-nro 125-84-8); heikko induktori (E2:n tuotanto) ja heikko inhibiittori (T:n tuotanto) bisfenoli A (CAS-nro 80-05-7) ja negatiivinen kemikaali istukkagonadotropiini (hCG) (CAS-nro 9002-61-3), kuten esitetään taulukossa 2. Erillisillä levyillä tehdään testiajo kaikista kemikaalista käyttäen taulukossa 6 esitettyä muotoa. Yksi laadunvalvontalevy (taulukko 4, 36–37 kohta) olisi sisällytettävä jokaiseen päivittäiseen testiajoon pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja varten.

Taulukko 2

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitetut kemikaalit ja altistuspitoisuudet

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitettu kemikaali	Testin pitoisuudet (μM)
Prokloratsi	0 [a], 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskoliini	0 [a], 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30

Pätevyyden osoittamiseen tarkoitettu kemikaali	Testin pitoisuudet (μM)
Atratsiini	0 [a], 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutetimidi	0 [a], 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenoli A	0 [a], 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 [a], 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

[a] Liuotinkontrolli (DMSO) (0), 1 μl DMSO/kuoppa.

H295R:n altistaminen pätevyyden osoittamiseen tarkoitetuille kemikaaleille olisi tehtävä 24-kuoppalevyllä laboratorion pätevyyttä koskevan testin aikana. Annosteluyksikkö on μM kaikissa testikemikaalin annoksissa. Annokset olisi annosteltava DMSO:hon 0,1 % v/v kuoppaa kohti. Kaikkia testipitoisuuksia olisi testattava kolmessa eri kuopassa (taulukko 6). Kustakin kemikaalista tehdään testiajo erillisellä levyllä. Kuhunkin päivittäiseen testiajoon sisältyy yksi laadunvalvontalevy.

35. Solujen elinkykyä ja hormoneja koskevat analyysit olisi suoritettava siten kuin 42–46 kohdassa esitetään. Raja-arvo (alhaisin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus, LOEC) ja luokittelu olisi ilmoitettava ja sitä olisi verrattava taulukossa 3 esitettyihin arvoihin. Tietoja pidetään hyväksyttävinä, jos niissä noudatetaan LOEC-arvoja ja luokittelupäätöstä, joka esitetään taulukossa 3.

Taulukko 3

Raja-arvot (LOEC-arvot) ja pätevyyden osoittamiseen tarkoitettuja kemikaaleja koskeva luokittelupäätös

	CAS-nro	LOEC (μM)		Luokittelupäätös	
		T	E2	T	E2
Prokloratsi	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ [a] (inhibitio)	+ (inhibitio)
Forskoliini	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (induktio)	+ (induktio)
Atratsiini	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (induktio)	+ (induktio)
Aminoglutetimidi	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (inhibitio)	+ (inhibitio)
Bisfenoli A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (inhibitio)	+ (induktio)
HCG	9002-61-3	ei sovelleta	ei sovelleta	negatiivinen	negatiivinen

[a] +, positiivinen

ei sovelleta: Ei sovelleta, koska mitään muutoksia ei pitäisi tapahtua negatiivisen kontrollin ei-sytotoksisille pitoisuuksille altistamisen jälkeen.

Laadunvalvontalevy

36. Laadunvalvontalevyä käytetään varmistamaan H295R-solujen toiminta vakiomuotoisissa soluviljelyolosuhteissa ja laatimaan määritystiedot hormonipitoisuuksille liuotinkontrolleissa, positiivisissa ja negatiivisissa kontrolleissa sekä ajan mittaan suoritettavissa muissa laadunvalvontatoimissa.

— H295R-solujen tehokkuutta olisi testattava käyttämällä laadunvalvontalevyä kustakin uudesta ATCC-erästä, tai sen jälkeen, kun aikaisemmin pakastettuja soluja käytetään ensimmäisen kerran, ellei tälle soluerälle ole tehty laboratorion pätevyyttä koskevaa testiajoa (32–34 kohta).

— Laadunvalvontalevyllä tehdään täydellinen arviointi testiolosuhteista (kuten solujen elinkyky, liuotinkontrollit, negatiiviset ja positiiviset kontrollit sekä testin sisäinen ja testien välinen vaihtelu) kemikaaleja testattaessa, ja sen pitäisi sisältyä kuhunkin testiajoon.

37. Laadunvalvontatesti tehdään 24-kuoppalevyllä. Sen osalta noudatetaan samaa inkubointia, annostusta, solujen elinkykyä/sytotoksisuutta, hormonien uuttamista ja hormonien analyysiä koskevia menettelyitä, joita kuvattiin testikemikaalien osalta 38–46 kohdassa. Laadunvalvontalevyyn sisältyy pelkkää kasvatusliuosta sisältäviä kohtia,

liuotinkontrolleja ja kaksi pitoisuutta tunnettua E2:n ja T:n synteesin induktoria (forskoliini, 1 ja 10 μM) ja inhibiittoria (prokloratsi, 0,1 ja 1 μM). Lisäksi MeOH:ia käytetään valituissa kuopissa positiivisena kontrollina elinkykyä/sytotoksisuutta koskevassa testissä. Yksityiskohtainen kuvaus levyn asettelusta esitetään taulukossa 4. Laadunvalvontalevyn osalta täytettävät kriteerit luetellaan taulukossa 5. Hormonin perustuotannon vähimmäismäärä T:n ja E2:n osalta olisi täytettävä liuotinkontrollikuopissa ja nollakoekuopissa.

Taulukko 4

Laadunvalvontalevyn asettelu, jossa testataan altistamattomien H295R-solujen toimintaa ja tunnetuille E2:n ja T:n tuotannon inhibiittoreille (PRO = prokloratsi) ja stimulaattoreille (FOR = forskoliini) altistettuja soluja. Alistamiskokeen päätyttyä ja kasvatusliuoksen poiston jälkeen kaikkiin MeOH-kuoppiin lisätään 70 % metanoliliuosta positiivisena kontrollina sytotoksisuudelle (ks. sytotoksisuutta koskeva koe, validointiraportin lisäys III (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Nollakoe [a]	Nollakoe [a]	Nollakoe [a]	Nollakoe [a] (+ MeOH) [b]	Nollakoe [a] (+ MeOH) [b]	Nollakoe [a] (+ MeOH) [b]
B	DMSO [c] 1 μl	DMSO [c] 1 μl	DMSO [c] 1 μl	DMSO [c] 1 μl (+ MeOH) [b]	DMSO [c] 1 μl (+ MeOH) [b]	DMSO [c] 1 μl (+ MeOH) [b]
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

[a] Nollakokeen kuoppiin sisältyy pelkästään kasvatusliuosta (eli ei liuotinta).
[b] Metanoli (MeOH) lisätään altistuksen jälkeen, ja kasvatusliuos poistetaan näistä kuopista.
[c] DMSO-liuotinkontrolli (1 μl/kuoppa).

Taulukko 5

Laadunvalvontalevyn suorituskriteerit

	T	E2
Hormonin perustuotanto liuotinkontrollissa	≥ 5 kertaa määritysraja	≥ 2,5 kertaa määritysraja
Induktio (10 μM forskoliini)	≥ 1,5 kertaa liuotinkontrolli	≥ 7,5 kertaa liuotinkontrolli
Inhibitio (1μM prokloratsi)	≤ 0,5 kertaa liuotinkontrolli	≤ 0,5 kertaa liuotinkontrolli

KEMIKAALIALTISTUSTA KOSKEVA MENETTELY

38. Esi-inkuboinnin jälkeen solut otetaan pois inkubaattorista (21 kohta) ja niitä tarkastellaan mikroskoopilla. Tarkoitus on varmistaa, että ne ovat hyvässä kunnossa (kiinnittyminen, morfologia) ennen annostelua.

39. Solut sijoitetaan biosuojakaappiin, lopullinen kasvatusliuos poistetaan ja korvataan uudella lopullisella kasvatusliuoksella (1 ml/kuoppa). DMSO:ta pidetään parhaana liuottimena tätä testimenetelmää varten. Jos on syitä käyttää muita liuottimia, tieteellisiä perusteita olisi selvitettävä. Solut altistetaan testikemikaalille lisäämällä 1 μl asianmukaista kantaliuosta DMSO:hon (ks. validointiraportin lisäys II (4)) 1 ml lopullista kasvatusliuosta kohti (kuopan tilavuus). Tämän perusteella DMSO:n lopullinen pitoisuus kuopissa on 0,1 %. Riittävän sekoituksen varmistamiseksi yleensä pidetään etusijaisena, että testikemikaalin asianmukaista kantaliuosta DMSO:ssa sekoitetaan lopullisen

kasvatusliuoksen kanssa, jotta kunkin annoksen osalta saadaan haluttu lopullinen pitoisuus, ja että seos lisätään kuhunkin kuoppaan välittömästi vanhan lopullisen kasvatusliuoksen poistamisen jälkeen. Jos tätä vaihtoehtoa käytetään, DMSO:n pitoisuuden (0,1 %) pitäisi pysyä tasaisena kaikissa kuopissa. Kuoppia, joihin sisältyy kaksi suurinta pitoisuutta, arvioidaan visuaalisesti saostumien tai sameuden muodostumisen osalta. Tämä on merkki siitä, että testikemikaalin liukoisuus on puutteellista. Arvioinnissa käytetään binokulaariluuppia. Jos tällaisia olosuhteita (saostumat, sameuden muodostumat) havaitaan, tutkitaan myös kuopat, joihin sisältyy alempia pitoisuuksia (ja niin edelleen), ja pitoisuudet, jotka eivät täysin liuenneet liuokseen, poistetaan myöhemmistä arvioinneista ja analyyseistä. Levy siirretään jälleen inkubaattoriin 37 °C:een ja ilman seokseen, johon sisältyy 5 % CO_2:ta normaali-ilmanpaineessa, 48 tunnin ajaksi. Testikemikaalin levyn asettelu esitetään taulukossa 6. Kantaliuokset 1–7 osoittavat testikemikaalin annoksien kasvavan määrän sijainnin.

Taulukko 6

Annostelukaava H295R-solujen altistamiselle testikemikaaleilla 24-kuoppalevyllä

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Kantaliuos 4	Kantaliuos 4	Kantaliuos 4
B	Kantaliuos 1	Kantaliuos 1	Kantaliuos 1	Kantaliuos 5	Kantaliuos 5	Kantaliuos 5
C	Kantaliuos 2	Kantaliuos 2	Kantaliuos 2	Kantaliuos 6	Kantaliuos 6	Kantaliuos 6
D	Kantaliuos 3	Kantaliuos 3	Kantaliuos 3	Kantaliuos 7	Kantaliuos 7	Kantaliuos 7

40. Altistukseen käytetyt levyt poistetaan inkubaattorista 48 tunnin jälkeen ja jokainen levy tutkitaan mikroskoopilla solujen kunnon (kiinnittyminen, morfologia, solutiheys) ja sytotoksisuutta koskevien merkkien osalta. Kunkin kuopan kasvatusliuos jaetaan kahteen yhtä suureen annokseen (kukin noin 490 µl) ja siirretään kahteen erilliseen asianmukaisesti merkittyyn pulloon (eli yhtenä eränä, jotta kutakin kuoppaa varten tarjotaan ylimääräinen näyte). Kasvatusliuos poistetaan solujen kuivumisen estämiseksi vaaka- tai pystyrivi kerrallaan ja korvataan kasvatusliuoksella, joka on tarkoitettu solun elinkykyä/sytotoksisuutta koskevaan testiin. Jos solun elinkykyä/sytotoksisuutta ei mitata välittömästi, kuhunkin kuoppaan lisätään 200 µl PBS:ää, johon sisältyy Ca^{2+} ja Mg^{2+}. Kasvatusliuokset pakastetaan – 80 °C:een jatkokäsittelyyn, jossa analysoidaan hormonien pitoisuuksia (ks. 44–46 kohta). Kasvatusliuoksessa – 80 °C:een pakastettu T ja E2 pysyy yleensä vakaana ainakin kolme kuukautta, ja kussakin laboratoriossa olisi dokumentoitava hormonien vakautta varastoinnin aikana.

41. Välittömästi kasvatusliuoksesta poistamisen jälkeen kunkin altistukseen käytetyn levyn solujen elinkyky/sytotoksisuus arvioidaan.

Solujen elinkyvyn määrittäminen

42. Solujen elinkykyä/sytotoksisuutta koskevaa testiä voidaan käyttää määrittämään testikemikaalin potentiaalinen vaikutus solujen elinkykyyn. Testillä pitäisi pystyä tarjoamaan todellinen järjestelmä kuopassa olevien elinkykyisten solujen (elävien solujen) prosenttiosuuden määrittämiseksi, tai sillä pitäisi osoittaa, että se on suoraan verrattavissa Live/Dead®-testiin (sen lineaariseen funktioon) (ks. validointiraportin lisäys III (4)). Vaihtoehtoinen testi, jonka on osoitettu toimivan yhtä hyvin, on MTT-testi (3-(4,5-dimetyylitiatsoli-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi-testi) (18). Solujen elinkyvyn (elävien solujen) arviointi edellä esitettyjä menetelmiä soveltamalla on suhteellinen mittaus, joka ei välttämättä osoita lineaarisia suhteita kuopan solujen absoluuttisen määrän kanssa. Tästä syystä analyysin suorittajan olisi tehtävä samanaikainen subjektiivinen silmämääräinen arvio kustakin kuopasta. Liuotinkontrolleista ja kahdesta suurimmasta ei-sytotoksisesta pitoisuudesta olisi otettava digitaalikuvia ja ne olisi arkistoitava, jotta myöhemmin voidaan arvioida todellista solutiheyttä, jos tätä edellytetään. Jos silmämääräinen arvio tai elinkykyyn/sytotoksisuutta koskeva testi osoittaa, että solujen määrä on nähtävästi lisääntynyt, tämä on tarkistettava. Jos solujen määrän lisääntyminen tarkistetaan, tämä olisi mainittava tutkimusselosteessa. Solujen elinkyky ilmaistaan suhteessa liuotinkontrollien keskimääräiseen vasteeseen, missä elinkykyisten (elävien) solujen osuus on 100 %. Tämä lasketaan tarvittaessa käytettyä solujen elinkykyä/sytotoksisuutta koskevaa testiä varten. MTT-testin osalta voidaan käyttää seuraavaa kaavaa:

% elinkykyisiä (eläviä) soluja = (vaste kuopassa – keskimääräinen MeOH-käsitellyssä (= 100 % kuolleita) kuopissa) ÷ (keskimääräinen vaste liuotinkontrollin kuopissa – keskimääräinen vaste MeOH-käsitellyissä (= 100 % kuolleita) kuopissa)

43. Kuoppia, joissa elävien solujen osuus on 80 % alhaisempi kuin liuotinkontrollin kuoppien keskimääräinen elinkyky (= 100 % eläviä soluja), ei pitäisi sisällyttää lopulliseen tietojen analyysiin. Steroidogeneesin inhibitiota, jota esiintyy, kun sytotoksisuus on lähes 20 %, olisi arvioitava huolellisesti, jotta varmistetaan, ettei sytotoksisuus ole syy inhibitioon.

Hormonien analyysi

44. Kukin laboratorio voi käyttää valitsemaansa hormonien mittausjärjestelmää T:n ja E2:n analyysiin. Kasvatusliuoksen ylimääräisiä eriä kustakin koeryhmästä voidaan käyttää valmistelemaan laimennoksia, jotta pitoisuus saadaan sisällytettyä standardikäyrän lineaarisen osan puitteisiin. Kuten 29 kohdassa todettiin, kaikkien laboratorion olisi osoitettava, että niiden hormonimittaukseen käytetty järjestelmä (kuten ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) täyttää laadunvalvontakriteerit siten, että siinä analysoidaan lopullista kasvatusliuosta — johon on lisätty kontrollihormoni –, ennen kuin laadunvalvontaa koskevat testiajot tai kemikaalien testaus suoritetaan. Jotta varmistetaan, että testijärjestelmän komponentit eivät häiritse hormonimittausta, hormonit voidaan joutua uuttamaan kasvatusliuoksesta ennen mittausta (ks. 30 kohta olosuhteista, joiden vallitessa siirtoa edellytetään tai sitä ei edellytetä). On suositeltavaa, että uuttaminen suoritetaan validointiraportin liitteessä III (4) tarkoitettuja menettelyitä noudattaen.

45. Jos hormonituotannon mittaukseen käytetään kaupallista testipakkausta, hormonianalyysi olisi suoritettava testipakkauksen valmistajan antaman käsikirjan mukaisesti. Useimmilla valmistajilla on oma menettely, jolla hormonianalyysit suoritetaan. Näytteiden laimennoksia on muutettava niin, että liuotinkontrollin odotettavissa olevat hormonipitoisuudet sijoittuvat yksittäisen testin standardikäyrän lineaarisen mittausalueen keskelle (validointiraportin lisäys III (4)). Standardikäyrän lineaarisen mittausalueen ulkopuolella olevat arvot olisi hylättävä.

46. Lopulliset hormonipitoisuudet lasketaan seuraavasti:

Esimerkki:

Uutettu:	450 µl kasvatusliuosta
Sekoitetaan määrään:	250 µl testin puskuriainetta
Laimennus testissä:	1:10 (näyte tuodaan standardikäyrän lineaarisen mittausalueen sisälle)
Hormonien pitoisuus testissä:	150 pg/ml (on jo mukautettu pitoisuuteen ml testattua näytettä kohti)
Talteenotto:	89 %
Lopullinen hormonipitoisuus =	(Hormonipitoisuus (ml kohti) ÷ talteenotto) (laimennustekijä)
Lopullinen hormonipitoisuus =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

Testipitoisuuksien valinta

47. Olisi tehtävä ainakin kaksi toisistaan riippumatonta testiajoa. Ellei ennakkoon saatavilla olevissa tiedoissa, jotka liittyvät esimerkiksi liukoisuusraja-arvoihin tai sytotoksisuuteen, tarjota perustaa testipitoisuuksien valinnalle, suositellaan, että ensimmäisen testiajon testipitoisuudet sijoitetaan logaritmisin välein $\log_{10}$, jossa 10^{-3} M on

maksimipitoisuus. Jos kemikaali liukenee ja se ei ole sytotoksinen missään testatussa pitoisuudessa ja ensimmäinen testiajo oli kaikkien pitoisuuksien osalta negatiivinen, tämä tulisi vahvistaa vielä yhdessä testiajossa soveltaen samoja edellytyksiä kuin ensimmäisessä testiajossa (taulukko 7). Jos ensimmäisen testiajon tulokset ovat *epävarmoja* (eli kerrannaismuutos on tilastollisesti merkitsevä liuotinkontrolliin nähden ainoastaan yhdessä pitoisuudessa) tai positiivinen (eli kerrannaismuutos kahdessa tai useammassa vierekkäisessä pitoisuudessa on tilastollisesti merkittävä), testi olisi toistettava taulukossa 7 esitetyllä tavalla mukauttamalla valittuja testipitoisuuksia. Testipitoisuuksia testiajoissa kaksi ja kolme (jos ne tehdään) olisi mukautettava ensimmäisen testiajon sellaisten näytepitoisuuksien perusteella, jotka aiheuttivat vaikutuksia puolen log:n pitoisuusvälejä käyttämällä (eli jos alkuperäinen testiajo pitoisuuksilla 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM johti induktioihin 1 ja 10 μM käsittelypitoisuuksilla, toisella testiajolla testattavien pitoisuuksien olisi oltava 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), ellei alempia pitoisuuksia pidä käyttää alhaisimman havaittavan vaikutuksen aiheuttavan pitoisuuden saavuttamiseksi. Jälkimmäisessä tapauksessa ainakin viittä pitoisuutta, jotka alittavat ensimmäisessä testiajossa testatun alimman pitoisuuden, olisi käytettävä toisessa testiajossa käyttäen puolen log:n välejä. Jos toisessa testiajossa ei vahvisteta ensimmäistä testiajoa (eli tilastollista merkitsevyyttä ei esiinny aikaisemmin positiiviseksi testatussa pitoisuudessa ± 1 pitoisuuden lisäys), kolmas koe voidaan suorittaa käyttäen alkuperäisiä testiolosuhteita. Epäselviä tuloksia ensimmäisessä testiajossa pidetään negatiivisina, jos havaittua vaikutusta ei voida vahvistaa missään kahdessa peräkkäisessä testiajossa. Epäselviä tuloksia pidetään positiivisina vasteina (vaikutus), kun vaste voidaan vahvistaa ainakin yhdessä muussa testiajossa, jossa on ± 1 pitoisuuden lisäys (ks. 55 kohta tietojen tulkintaa koskevan menettelyn osalta)

Taulukko 7

Päätösmatriisi mahdollisille tuloksia koskeville skenaarioille

Testiajo 1	Testiajo 2		Testiajo 3		Päätös	
Skenaario	Päätös	Skenaario	Päätös	Skenaario	Myönteinen	Kielteinen
Negatiivinen	Vahvista [a]	Negatiivinen	Lopeta			X
Negatiivinen	Vahvista [a]	Positiivinen	Tarkenna [b]	Negatiivinen		X
Epäselvä [c]	Tarkenna [b]	Negatiivinen	Vahvista [a]	Negatiivinen		X
Epäselvä [c]	Tarkenna [b]	Negatiivinen	Vahvista [a]	Positiivinen	X	
Epäselvä [c]	Tarkenna [b]	Positiivinen			X	
Positiivinen	Tarkenna [b]	Negatiivinen	Vahvista [a]	Positiivinen	X	
Negatiivinen	Vahvista [b]	Positiivinen	Tarkenna [b]	Positiivinen	X	
Positiivinen	Tarkenna [b]	Positiivinen	Lopeta		X	

[a] Vahvista edellinen testiajo käyttämällä samaa koesuunnittelua.
[b] Tee uusi testiajo käyttäen puolen login pitoisuusvälejä (ryhmitä pitoisuudet, joiden testi erosi huomattavasti edellisessä kokeessa).
[c] Kerrannaismuutos yhdessä pitoisuudessa poikkeaa tilastollisesti merkitsevästi liuotinkontrollista.

Laadunvalvonta testilevyllä

48. Sen lisäksi, että laadunvalvontalevyn kriteerit täyttyvät, muut laadunvalvontakriteerit, jotka koskevat hyväksyttävää vaihtelua rinnakkaisten levyjen välillä, rinnakkaisia kokeita, hormonien mittausjärjestelmien lineaarisuutta ja herkkyyttä, samaa näytettä koskevien rinnakkaisten hormonien mittausten vaihtelua ja hormonilisäyksien talteenottoprosenttia kasvatusliuoksen uuttamisen jälkeen (jos tämä tehdään, katso 30 kohta uuttamista koskevista vaatimuksista), olisi täytettävä, ja ne esitetään taulukossa 8. Tietojen pitäisi sopia hyväksyttäviin vertailuväleihin, jotka määritellään kutakin sellaista parametria kohden, jota tarkastellaan täydentävää arviointia varten. Jos nämä kriteerit eivät täyty, taulukossa olisi todettava, että kyseinen näyte ei täytä laadunvalvontakriteerejä, ja näytettä olisi analysoitava uudelleen tai se olisi poistettava tietokokonaisuudesta.

Taulukko 8

Hyväksyttävät vertailuvälit ja/tai vaihtelu (%) H295R-testin testilevyn parametreja varten.

LOQ: hormonien mittausjärjestelmän määritysraja. CV: variaatiokerroin; SC: liuotinkontrolli; DPM: hajoaminen minuuttia kohti (disintegration per minute)

	Vertailu välillä	T	E2
Hormonin perustuotanto liuotinkontrollissa	Kertaväli suurempi kuin LOQ	≥ 5-kertainen	≥ 2,5-kertainen
Altistuskokeet — levyllä, variaatiokerroin liuotinkontrolleja varten (rinnakkaiset levyt)	Absoluuttiset pitoisuudet	≤ 30 %	≤ 30 %
Altistuskokeet — levyjen välillä, variaatiokerroin liuotinkontrolleja varten (toistetut kokeet)	Kerrannaismuutos	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormonien mittausmenetelmän herkkyys	Liuotinkontrolliin liittyvä havaittavissa oleva kertavähennys	≥ 5-kertainen	≥ 2,5-kertainen
Hormonien mittausmenetelmä — toistetut toimenpiteet, variaatiokerroin liotinkontrolleja varten [a]	Absoluuttiset pitoisuudet	≤ 25 %	≤ 25 %
Kasvatusliuoksen uuttaminen — sisäisen 3H-standardin uudelleenkäyttö (jos sovelletaan)	DPM	≥ 65 % nimellinen	

[a] Viittaa samaa näytettä koskeviin toistettuihin toimenpiteisiin.

TIETOJEN ANALYSOINTI JA RAPORTOINTI

Tietojen analysointi

49. Kemiallisesti muunnetun hormonintuotannon suhteellisen lisäyksen/vähennyksen arvioimiseksi tuloksia olisi normalisoitava kunkin testilevyn liuotinkontrollin keskiarvoon nähden, ja tulokset olisi ilmaistava muutoksena suhteessa liuotinkontrolliin kullakin testilevyllä. Kaikki tiedot ilmaistaan keskimääräisenä ± 1 keskihajontana.

50. Ainoastaan hormonitiedot kuopista, joissa sytotoksisuus on alle 20 %, pitäisi sisällyttää tietojen analysointiin. Suhteelliset muutokset lasketaan seuraavasti:

Suhteellinen muutos = (hormonien pitoisuus kussakin kuopassa) ÷ (keskimääräinen hormonipitoisuus kaikissa liuotinkontrollin kuopissa).

51. Jos kuopan silmämääräinen tutkimus tai 42 kohdassa kuvattu elinkykyä/sytotoksisuutta koskeva testi osoittaa, että solujen määrä on nähtävästi lisääntynyt, tämä on tarkistettava. Jos solujen määrän lisääntyminen tarkistetaan, tämä olisi mainittava tutkimusselosteessa.

52. Ennen tilastoanalyysien tekoa oletuksia normaalisuudesta ja varianssien homogeenisuudesta olisi arvioitava. Normaalisuutta olisi arvioitava käyttämällä tavallisia todennäköisyyskuvioita tai muita asianmukaisia tilastotieteellisiä menetelmiä (kuten Shapiron-Wilkin testi). Jos tiedot (kertamuutokset) eivät jakaudu normaalisti, tietoja olisi pyrittävä mukauttamaan lähelle normaalia jakaumaa. Jos tiedot jakautuvat normaalisti tai ovat lähellä normaalia jakaumaa, kemikaalipitoisuutta koskevien ryhmien ja liuotinkontrollien välisiä eroja olisi analysoitava käyttämällä parametrista testiä (kuten Dunnettin testiä), jossa *pitoisuus* on riippumaton muuttuja ja *vaste* (kertamuutos) on riippuva muuttuja. Jos tiedot eivät jakaudu normaalisti, olisi käytettävä asianmukaista ei-parametrista testiä (kuten Kruskal Wallis -testiä, Steel's Many-one rank -testiä) Eroja pidetään merkitsevinä, kun $p \leq 0{,}05$. Tilastollisia arviointeja tehdään kunkin kuopan keskimääräisten arvojen perusteella. Ne edustavat riippumattomia kaksoismääritettyjä datapisteitä. On odotettavissa, että ensimmäisen testiajon annosten suuren välin ($\log_{10}$-asteikko) vuoksi monissa tapauksissa ei ole mahdollista määritellä selvää pitoisuus-vaste-suhdetta, jossa kaksi suurinta annosta on sigmoidikäyrän lineaarisessa osassa. Tästä syystä ensimmäisessä testiajossa tai kaikissa muissa tietojen kartoitustoimissa, missä tämä olosuhde esiintyy (eli missä ei voida arvioida suurinta tehokkuutta), sovelletaan edellä mainitut tyypin 1 kiinteitä muuttujia koskevia tilastotietoja.

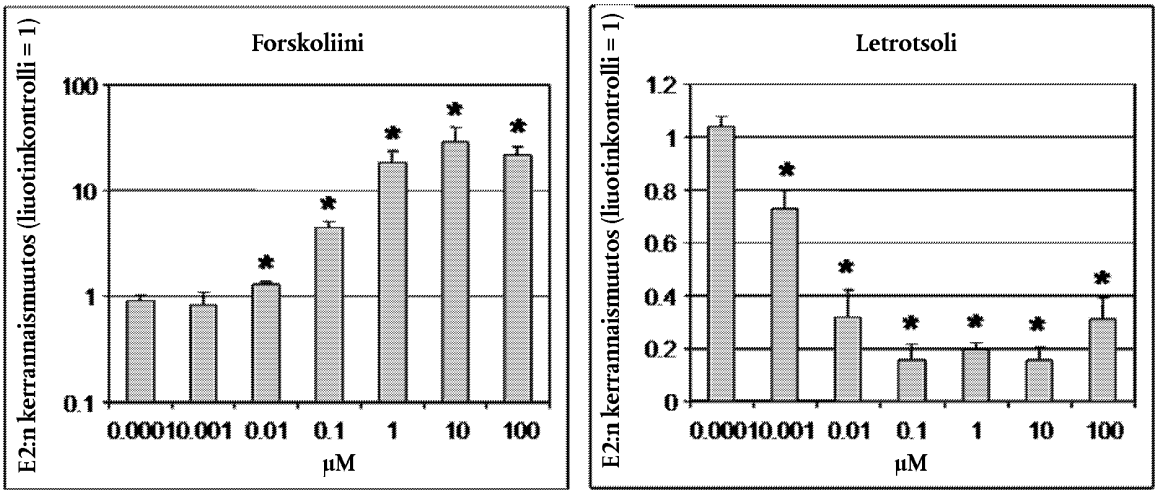
53. Jos enemmän kuin kaksi datapistettä on käyrän lineaarisessa osassa ja jos suurin tehokkuus voidaan laskea — kuten on odotettavissa joissakin toisissa testiajoissa, jotka suoritetaan käyttäen puolen login pitoisuusvälejä — todellisten pitoisuuksien laskentaan olisi käytettävä probitti- tai logittimallia taikka muuta asiaankuuluvaa regressiomallia (kuten EC50 ja EC20).

54. Tulokset olisi annettava graafisessa (pylväskuvaajat edustavat keskiarvoa +/– 1 keskihajonta) ja taulukkomuodossa (LOEC/NOEC, vaikutuksen suunta ja suurimman vasteen voimakkuus, joka kuuluu tietojen annos-vasteosaan) (ks. esimerkkiä varten kuva 3) Tietojen arviointia pidetään pätevänä ainoastaan, jos se perustuu ainakin kahteen toisistaan riippumattomasti suoritettuun testiajoon. Testiä tai testiajoa pidetään riippumattoman, jos se on suoritettu eri päivänä käyttäen uudenlaisia liuoksia ja kontrollia. Testiajossa 2 ja 3 (tarvittaessa) käytettyjen pitoisuuksien mittausaluetta voidaan suunnitella ja toteuttaa testiajon 1 tulosten perusteella, jotta määritellään paremmin LOEC:in sisältämä annos-vaste-alue (ks. 47 kohta).

Kuva 3

Esimerkki H295R-testin suorittamisen aikana saatujen tietojen esittämisestä ja arvioinnista graafisessa ja taulukkomuodossa.

Asteriskit osoittavat tilastollisesti merkittävät erot liuotinkontrolliin nähden ($p < 0,05$). LOEC: alhaisin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus; Maksimimuutos: missä tahansa pitoisuudessa havaitun vasteen suurin vahvuus verrattuna keskimääräiseen liuotinkontrollin vasteeseen (= 1)



Chemical	LOEC	Max Change
Forskolin	0,01	0,15 fold
Letrozole	0,001	29 fold

Tietojen tulkintaa koskeva menettely

55. Testikemikaalia pidetään positiivisena, jos koetoiminnan suhde kontrolliin on tilastollisesti erilainen ($p \leq 0,05$) liuotinkontrolliin nähden kahden vierekkäisen pitoisuuden osalta ainakin kahdessa toisistaan riippumattomassa testiajossa (taulukko 7). Testikemikaalia pidetään negatiivisena kahden riippumattoman negatiivisen testiajon perusteella, tai kolmen testiajon perusteella, jos kaksi niistä on negatiivista ja yksi epäselvä tai positiivinen. Jos kolmessa riippumattomassa kokeessa saadut tiedot eivät täytä taulukossa 7 lueteltuja päätöskriteereitä, koetulokset eivät ole tulkittavissa. Tuloksia, joissa pitoisuudet ylittävät liukoisuusrajat tai solumyrkyllisyyspitoisuuden rajat, ei pitäisi sisällyttää tulosten tulkintaan.

Tutkimusseloste

56. Tutkimusselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testauslaitos

— laitoksen nimi ja sijainti

— tutkimusjohtaja ja muu henkilöstö ja heidän tutkimusta koskevat vastuualueensa

— testin alku- ja päättymispäivä

Testikemikaali, reagenssit ja kontrollit

— testikemikaalin, reagenssien ja kontrollien tunnistetiedot (nimi/CAS-nro tarvittaessa) lähde, erän/annoksen numero, puhtaus, toimittaja ja kuvaus

— testikemikaalin fysikaalinen olomuoto ja asiaankuuluvat fysikokemialliset ominaisuudet

— varastointiolosuhteet ja testikemikaalien, reagenssien ja kontrollien valmistuksen menettely ja valmistustiheys

— testikemikaalin stabiilius.

Solut

— solujen lähde ja tyyppi

— testissä käytettyjen solujen pasaasinumerot (solujen jakamiskerran tunniste)

— soluviljelmien ylläpitoa koskevien menettelyiden kuvaus.

Vaatimukset ennen testiä (jos sovelletaan)

— testin, jossa arvioidaan, häiritseekö kemikaali hormonituotantoa (Chemical Hormone Assay Interference Test), kuvaus ja siitä saadut tulokset

— hormonien uuton tehokkuutta koskevien toimenpiteiden kuvaus ja tulokset

— standardikäyrät ja kalibrointikäyrät kaikille toteutettaville analyyttisille määrityksille

— valittujen analyyttisten määritysten määritysrajat.

Testiolosuhteet:

— kasvatusliuoksien koostumus

— testikemikaalin pitoisuus

— solutiheys (arvioidut ja mitatut solutiheydet 24 tunnin ja 48 tunnin välein)

— testikemikaalin liukoisuus (liukoisuusraja, jos se määritetään)

— inkubointiaika ja -olosuhteet.

Testin tulokset

— käsittelemättömät tiedot kustakin kontrollin ja testikemikaalin kuopasta — kaikki toiset toimet, jotka esitetään alkuperäistiedoissa, jotka saadaan hormonintuotannon mittaamiseen käytetyllä välineellä (esim. optinen tiheys, fluoresenssiyksiköt, hajoaminen minuuttia kohti)

— normaalisuuden validointi tai selvitys tietojen muunnoksesta

— keskimääräiset vasteet +/– 1 keskihajonta, kutakin mitattua kuoppaa kohti

— sytotoksisuustiedot (testipitoisuudet, jotka aiheuttavat sytotoksisuutta)

— vahvistus siitä, että laadunvalvontavaatimukset täytettiin

— suhteellinen muutos verrattuna liuotinkontrolliin, jota on korjattu sytotoksisuuden osalta

— pylväskuvaaja, joka osoittaa suhteen (kerrannaismuutos) kussakin pitoisuudessa, keskihajonnan ja tilastollisen merkityksen, kuten esitettiin 49–54 kohdassa.

Tietojen tulkinta

— sovella tietojen tulkintaa koskeva menettelyä tuloksiin ja käsittele havaintoja.

Pohdinta

— käykö tutkimuksesta ilmi mahdollisuus, että gluko- ja mineraalikortikoideja koskevien reittien epäsuorat vaikutukset ovat voineet vaikuttaa T/E2-tietoihin?

Päätelmät

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) OECD (2002), OECD:n hormonaalisten haitta-aineiden testausta ja arviointia koskevat käsitteelliset puitteet (OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals), tämän liitteen B.54 luvussa oleva lisäys 2.

(2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114–124.

(3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23–30.

(4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Available at [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746, en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis, Available at: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

(7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78–89.

(8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44–54.

(9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265–272.

(10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137–1148.

(11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488–5496.

(12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578–584.

(13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777–2785.

(14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137–1148.

(15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731–737.

(16) Tämän liitteen B.55 luku, 'Rotilla tehtävä Hershbergerin biotesti: lyhytaikainen seulontatesti androgeenisista (anti-androgeenisista) ominaisuuksista'.

(17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222–231.

(18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55–63.

(19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598–1606.

(20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484–492.

Lisäys

MÄÄRITELMÄT:

Konfluenttisuudella tarkoitetaan peittävyyttä tai jakaantuvuutta, joka sallitaan soluille kasvatusliuoksessa.

Kemikaalilla tarkoitetaan ainetta tai aineiden seosta.

Variaatiokertoimella tarkoitetaan keskihajonnan ja aritmeettisen keskiarvon osamäärää

CYP:llä tarkoitetaan sytokromin P450 mono-oksigenaaseja, niistä tuotettua geeni- ja entsyymiperhettä, joka osallistuu erilaisten biokemiallisten reaktioiden katalysointiin, mukaan lukien steroidihormonien synteesi ja aineenvaihdunta.

DPM:llä tarkoittaa hajoamista minuuttia kohti (disintegration per minute). Kyseessä on tietyssä määrässä radioaktiivista materiaalia oleva atomien määrä, jonka havaitaan hajoavan yhden minuutin aikana.

E2:lla tarkoitetaan 17β-estradolia, nisäkkäiden elimistön tärkeintä estrogeenia.

H295R-soluilla tarkoitetaan ihmisen adreno-karsinooma-soluja, jotka ovat fysiologisilta ominaispiirteiltään sikiön erilaistumattomia lisämunuaisen soluja ja jotka ilmentävät kaikkia streroidogeneesin entsyymejä. Ne ovat saatavilla ATCC:ltä.

Pakastusliuosta käytetään pakastamaan ja varastoimaan pakastettuja soluja. Se koostuu kasvatusliuoksen kantaliuoksesta, johon lisätään BD NuSerum -seeruminkorviketta ja dimetyylisulfoksidia.

Lineaarisella mittausalueella tarkoitetaan vaihteluväliä hormonin mittausjärjestelmän standardikäyrällä, jossa tulokset ovat verrannollisia näytteessä läsnä olevan analyytin pitoisuuteen.

Määritysrajalla tarkoitetaan pienintä määrää kemikaalia, joka voidaan erottaa siitä, että kyseistä kemikaalia ei esiinny (tyhjä arvo) todetulla luottamustasolla. Tässä menetelmässä testijärjestelmien valmistaja määrittelee tavanomaisesti määritysrajan, jos ei toisin ilmoiteta.

LOEC:illa tarkoitetaan alhaisimman havaittavaan vaikutuksen aiheuttavaa pitoisuutta, jossa testireaktio poikkeaa tilastollisesti liuotinkontrollista.

NOEC:illa tarkoitetaan pitoisuutta, joka aiheuta havaittavaa vaikutusta, mikä on korkein testattu pitoisuus, jos testi ei tarjoa positiivista reaktiota.

Pasaasilla tarkoitetaan niiden kertojen lukumäärää, jolloin solut jaetaan sen jälkeen kun viljelmä aloitetaan pakastetusta varastosta (jakamiskerta). Ensimmäisen pakastetusta varastosta aloitetun viljelmän pasaasinumero on yksi (1). Solut, jotka jaetaan yhden kerran merkitään pasaasinumerolla 2.

PBS:llä tarkoitetaan Dulbeccon fosfaattipuskuroitua suolaliuosta.

Laadunvalvonnalla tarkoitetaan toimenpiteitä, joita tarvitaan validien tietojen varmistamiseen.

Laadunvalvontalevyllä tarkoitetaan 24-kuoppalevyä, johon sisältyy positiivisen ja negatiivisen kontrollin kaksi pitoisuutta, joilla seurataan uuden soluerän tehokkuutta tai jolla tarjotaan kemikaalien testauksen ohessa positiivinen kontrolli testille.

Testiajolla tarkoitetaan erillistä koetta, jossa käytetään uudenlaisia liuoksia ja kontrolleja.

Kasvatusliuoksen kantaliuoksella tarkoitetaan muiden reagenssien valmistelua varten käytettävää ainetta. Se koostuu 1:1 seoksesta DMEM-kasvatusliuosta (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ja DMEM/F12-kasvatusliuosta (Ham's F-12 Nutrient mixture) 15 mM:ssa Hepes-puskuria ilman fenoolipunaa tai natriumbikarbonaattia. Natriumbikarbonaatti lisätään puskuriksi, ks. validointiraportin lisäys II (4).

Lopullinen kasvatusliuos koostuu kasvatusliuoksen kantaliuoksesta, johon on lisätty ainetta BD seeruminkorvike ja ITS + premium mix, ks. validointiraportin lisäys II (4).

Steroidogeneesillä tarkoitetaan synteesireittiä, joka johtaa kolesterolista useisiin steroidihormoneihin. Useat reaktion välituotteet steroidisynteesireitillä, kuten progesteroni ja testosteroni, ovat jo itsessään tärkeitä hormoneja, mutta ne toimivat myös esiasteena synteesireitin loppupäässä oleville hormoneille (lopputuote).

T:llä tarkoitetaan testosteronia, yhtä nisäkkäiden elimistön kahdesta tärkeimmästä androgeenista.

Testikemikaalilla tarkoitetaan mitä tahansa ainetta tai seosta, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää.

Testilevyllä tarkoitetaan levyä, jolla H295R-solut altistetaan testikemikaaleille. Testilevyille sisältyy liuotinkontrolli ja testikemikaali seitsemällä pitoisuustasolla kolmena kappaleena.

Trypsiini 1X:llä tarkoitetaan laimennettua liuosta, joka koostuu trypsiini-entsyymistä, haiman seriiniproteasista, jota käytetään irrottamaan soluja viljelylevyiltä, ks. validointiraportin lisäys III (4).

B.58. SIIRTOGEENISTEN JYRSIJÖIDEN SOMAATTISTEN SOLUJEN JA SUKUSOLUJEN GEENIMUTAATIOTESTIT

JOHDANTO

1. Tämä testimenetelmä vastaa OECD:n testiohjetta 488 (2013). EU:n testimenetelmiä on saatavilla laajasta valikoimasta *in vitro* -mutaatiotestejä, joissa voidaan havaita kromosomi- ja/tai geenimutaatioita. *In vivo* -päätetapahtumia (eli kromosomimuutokset ja ennakoimaton DNA-synteesi) varten on käytössä testimenetelmiä; niillä ei kuitenkaan mitata geenimutaatioita.Siirtogeenisten jyrsijöiden mutaatiotestit täyttävät geenimutaatioiden osalta käytännöllisten ja laajasti saatavilla olevien *in vivo* -testien tarpeen.

2. Siirtogeenisten jyrsijöiden mutaatiotestejä on tarkasteltu laajasti uudelleen (24)(33). Niissä käytetään siirtogeenisiä rottia ja hiiriä, joissa on useita kopioita kromosomisesti integroituja plasmideja tai faagien sukkulavektoreita. Siirtogeeneihin sisältyy reportterigeenejä, joilla havaitaan monenlaisia mutaatioita, joita testikemikaalit indusoivat *in vivo*.

3. Jyrsijässä aiheutuvat mutaatiot merkitään muistiin ottamalla siirtogeeni talteen ja analysoimalla reportterigeenin fenotyyppiä bakteeri-isännässä, joka on reportterigeenin osalta vaillinainen. Siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotesteissä mitataan mutaatioita, joita ovat aiheuttaneet geneettisesti neutraalit geenit, jotka on otettu talteen lähes mistä tahansa jyrsijän kudoksesta. Tästä syystä näissä testeissä kierretään useita nykyisiä rajoituksia, jotka liittyvät endogeenisten geenien *in vivo* -geenimutaatioita koskevaan tutkimukseen (kuten rajallinen määrä testiin sopivia kudoksia, negatiivinen/positiivinen valinta mutaatioita vastaan).

4. Todisteet viittaavat siihen, että siirtogeenit vastaavat mutageeneihin samalla tavoin kuin endogeenisiin geeneihin erityisesti, kun kyseessä on emäsparien korvauksen, lukukehysmutaatioiden ja pienten deleetioiden ja insertioiden havainnointi (24).

5. Genotoksisuuden testaamista käsittelevissä kansainvälisissä työryhmissä (International Workshops on Genotoxicity Testing, IWGT) on hyväksytty siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestien sisällyttäminen geenimutaatioiden detektioon *in vivo*, ja se on suositellut testiprotokollaa niiden toteuttamista varten (15)(29). Tämä testimenetelmä perustuu näihin suosituksiin. Täydentävä analyysi, jolla tuetaan tämän testiprotokollan käyttämistä, sisältyy lähteeseen (16).

6. On odotettavissa, että tulevaisuudessa voi olla mahdollista yhdistää siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestit toistuvan annostelun toksisuustutkimuksiin (tämän liitteen B.7 luku). Tietoja tarvitaan kuitenkin sen varmistamiseksi, että siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestien herkkyyteen ei vaikuteta altistusajan lopun ja näytteenottoajan välisellä lyhyemmällä yhden vuorokauden ajanjaksolla, jota sovelletaan toistuvan annostelun tutkimuksissa, verrattuna siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotesteissä käytettyyn kolmeen vuorokauteen. Tarvitaan myös tietoja jotka osoittavat, että toistuvan annostelun tutkimuksiin ei vaikuteta haitallisesti, koska tavanomaisten jyrsijäkantojen sijaan käytetään siirtogeenisiä jyrsijäkantoja. Kun nämä tiedot ovat saatavilla, tätä testimenetelmää päivitetään.

7. Keskeisten termien määritelmät esitetään liitteessä.

ALUSTAVAT NÄKÖKOHDAT

8. Siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestit, joiden osalta on saatavilla tarpeeksi tietoa, jotta niitä voidaan käyttää tässä testimenetelmässä, ovat: *lacZ* bacteriophage mouse -malli (MutaäMouse -malli); *lacZ* plasmid mouse -malli; *gpt* delta (*gpt* ja Spi$^-$)mouse ja rat -mallit; *lacI* mouse -malli ja *lacI* rat -malli (Big Blue® -malli), sellaisina kuin ne suoritetaan tavanomaisissa olosuhteissa. Lisäksi positiivista valintaa koskevaa *cII*-testiä voidaan käyttää arvioimaan mutaatioita Big BlueÒ- ja MutaäMouse-malleissa. Mutageneesiä siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestien malleissa arvioidaan normaalisti mutaatiofrekvenssillä; lisätietoja voidaan saada tarvittaessa mutaatioiden molekyylianalyysillä (ks. 24 kohta).

9. Nämä jyrsijöiden *in vivo* geenimutaatiotestit soveltuvat erityisesti mutageenisuusvaaran arvioimiseen, sillä testin vasteet riippuvat *in vivo* metaboloinnista, farmakokinetiikasta, DNA:n korjautumisprosesseista ja transleesio-DNA-synteesistä, joskin näissä saattaa esiintyä eroja lajien ja kudosten sekä DNA-vaurioiden tyyppien välillä. Geenimutaatioita koskeva *in vivo* -testi on hyödyllinen, jotta *in vitro* -järjestelmässä havaittua mutageenistä vaikutusta tutkitaan enemmän ja jotta suoritetaan testitulosten seuranta käyttäen muita *in vivo* -päätetapahtumia (24). Sen lisäksi, että geenimutaatiot ovat syy-yhteydellisiä syövän syntyyn, ne muodostavat olennaisen päätetapahtuman, jolla ennustetaan mutaatioon perustuvia muita kuin syöpäsairauksia somaattisissa kudoksissa (12)(13) sekä sairauksia, jotka tarttuvat ituradan välityksellä.

10. Jos on näyttöä siitä, että testikemikaali tai merkityksellinen metaboliitti ei ulotu mihinkään kohdekudoksiin, siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotestien suorittaminen ei ole tarkoituksenmukaista.

TESTIN PERIAATE

11. Edellä 8 kohdassa kuvatuissa testeissä kohdegeeni on alkuperältään bakteeri tai bakteriofagi, ja tapa saada näyte jyrsijän genomisesta DNA:sta on siirtogeenin sitoutuminen λ-bakteriofaagiin tai plasmidisukkulavektoriin. Menettelyyn sisältyy genomisen DNA:n ekstraktio jyrsijän kohdekudoksesta, genomisen DNA:n *in vitro* -käsittely (eli λ-vektorien pakkaaminen tai plasmidien ligaatio ja elektroporaatio sukkulavektorin tuottamiseksi) ja sitä seuraava mutaatioiden seulonta bakteeri-isännissä sopivissa olosuhteissa. Testissä käytetään neutraaleja siirtogeenejä, jotka voidaan helposti kerätä useimmista kudoksista.

12. Jyrsijöiden geenimutaatiota mittaavassa perustestissä jyrsijä altistetaan kemikaalille tietyn ajanjakson ajan. Kemikaalit voidaan antaa minkä tahansa annostelureitin, myös implantaation kautta (esim. lääkinnällisten laitteiden testaus). Sitä ajanjaksoa kokonaisuudessaan, jolloin eläimelle annetaan annoksia, kutsutaan *altistusajaksi*. Altistusta seuraa ennen lopettamista yleensä ajanjakso, jonka aikana kemikaalia ei anneta ja jonka aikana korjaamattomat DNA-vauriot kiinnittyvät stabiileihin mutaatioihin. Tätä ajanjaksoa kutsutaan ammattikirjallisuudessa usein ilmenemisajaksi (manifestation time), kiinnitysajaksi (fixation time) tai ilmentymisajaksi (expression time), tämän ajanjakson loppua kutsutaan näytteenottoajaksi (15)(29). Eläimen lopettamisen jälkeen genominen DNA eristetään testin kohteena olevasta kudoksesta (kudoksista) ja se puhdistetaan.

13. Tiedot yhdestä kudoksesta eläintä kohti useista pakkauksista/ligaatioista kootaan yleensä yhteen ja mutaatiotaajuus arvioidaan yleensä käyttäen yhteensä 10^5 ja 10^7 plakkia muodostavaa tai pesäkkeitä muodostavaa yksikköä. Jos käytetään positiivisia valintamenetelmiä, plakkia muodostavien yksiköiden kokonaismäärä määritellään käyttäen erillisiä ei-selektiivisiä maljoja.

14. Positiivisia valintamenetelmiä on kehitetty, jotta mutaatioiden seulontaa *helpotetaan* gpt-geenissä (*gpt delta mouse and rat* -malli, *gpt*$^-$-fenotyyppi (20)(22)(28)) ja *lacZ*-geenissä (Muta™Mouse- tai *lacZ* plasmid mouse -malli (3)(10)(11)(30)); *lacI*-geenimutaatiot Big Blue® -eläimissä seulotaan non-selektiivisellä mallilla, jossa mutantit seulotaan värillisten (sinisten) plakkien syntymisen välityksellä. Käytössä on myös positiivinen valintamenettely, jolla havaitaan pistemutaatioita, jotka syntyvät λ-bakteriofaagin sukkulavektorin *cII*-geenissä (Big Blue® mouse -malli tai rat -malli ja Muta™Mouse -malli (17)) ja deleetiomutaatioina λ *red*- ja *gam*-geeneissä(Spi$^-$-valinta *gpt* delta mouse- ja rat-malleissa (21)(22)(28)). *Mutaatiotaajuus* lasketaan jakamalla siirtogeenin mutaatioita sisältävien plakkien/plasmidien määrä samasta DNA-näytteestä kerättyjen plakkien/plasmidien kokonaismäärän kanssa. Siirtogeenisten jyrsijöiden geenimutaatiotutkimuksissa ilmoitettu parametri on mutaatiotaajuus. Lisäksi *mutaatiotaajuus* voidaan määritellä niiden solujen osuudeksi, joissa on *yksittäisiä* mutaatioita; tämä laskentatapa vaatii korjausta kloonaalisen laajenemisen osalta sekvensoimalla kerätyt mutantit (24).

15. Mutaatioita, joita tutkitaan *lacI-, lacZ-, cII-* ja *gpt point mutation* -mallien testeissä, koostuvat pääosin emäsparin korvautumista koskevista mutaatioista, lukukehysmutaatioista ja pienistä insertioista/deleetioista. Näiden mutaatiotyyppien suhteellinen osuus spontaanien mutaatioiden keskuudessa on samankaltainen, mikä voidaan havaita endogeenisessa *Hprt*-geenissä. Suuria deleetioita havaitaan ainoastaan Spi$^-$-valintaaja *lacZ* plasmid -malleja koskevassa testissä (24). Testin kannalta merkittävät mutaatiot ovat hiirelle tai rotalle aiheutuvat *in vivo* -mutaatiot. *In vitro-* ja *ex vivo* -mutaatiot, jotka voivat aiheutua faagin/plasmidin näytteenoton, replikoinnin tai korjautumisen aikana, ovat erittäin harvinaisia, ja ne voidaan joissain järjestelmissä erityisesti havaita tai sulkea pois bakteeri-isäntää/positiivista valintaa koskevalla järjestelmällä.

MENETELMÄN KUVAUS

Testin valmistelu

Eläinlajin valinta

16. Tällä hetkellä on saatavilla useita siirtogeenisten hiirten geenimutaatioiden seulontamalleja, ja näitä on käytetty laajemmin kuin siirtogeenisiä rottia koskevia malleja. Jos rotta on selkeästi tarkoituksenmukaisempi malli kuin hiiri (esim. jos tutkitaan karsinogeneesin mekanismia ainoastaan rotilla esiintyvästä kasvaimesta, jos saatetaan tiedot vastaavuussuhteeseen rotilla tehtävien myrkyllisyystutkimusten kanssa tai jos rotan metabolian tiedetään olevan ihmisen metabolian kannalta edustavampi), olisi harkittava siirtogeenisiä rottia koskevien mallien käyttöä.

Koe-eläinen häkit ja ruokinta

17. Koe-eläinhuoneen lämpötilan pitäisi olla ihanteellisesti 22 °C (± 3 °C). Vaikka suhteellisen kosteuden pitäisi olla vähintään 30 % eikä mielellään yli 70 % muulloin kuin huoneen puhdistuksen aikana, pitäisi kuitenkin pyrkiä 50–60 %:n suhteelliseen kosteuteen. Huoneessa olisi käytettävä keinovalaistusta 12 tunnin jaksoissa (12 tuntia valoa, jonka jälkeen 12 tuntia pimeää). Eläinten ruokinnassa voidaan käyttää normaalia laboratorioruokavaliota, eikä juomaveden määrää saa rajoittaa. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa sopiva sekoitus testikemikaalia, kun sitä annetaan tätä reittiä. Samaa sukupuolta olevat eläimet olisi pidettävä häkeissä pienissä ryhmissä (enintään viisi), jos minkäänlaista aggressiivista käytöstä ei ole odotettavissa. Eläimet voivat olla häkissä yksittäin, jos tämä on tieteellisesti perusteltua.

Eläinten valmistelu

18. Terveet nuoret ja sukukypsät täysikasvuiset eläimet (8–12 viikon ikäiset käsittelyn alkaessa) jaetaan satunnaisesti kontrolli- ja testiryhmiin. Jokainen eläinyksilö tunnistetaan. Eläimiä totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden vuorokauden ajan. Häkit on sijoitettava siten, että niiden sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Tutkimuksen alkaessa eläinten painonvaihtelun olisi oltava vähäistä, ja se saa vaihdella korkeintaan ± 20 % kunkin sukupuolen tavanomaisesta keskiarvosta.

Annosten valmistelu

19. Kiinteät testattavat kemikaalit liuotetaan tai sekoitetaan asianmukaisiin liuottimiin tai kantaja-aineisiin taikka lisätään ravintoon tai juomaveteen, ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset testattavat kemikaalit voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Testikemikaaleja voidaan antaa hengitystien kautta tapahtuvan altistamisen osalta kaasuna, höyrynä tai kiinteänä/nestemäisenä aerosolina niiden fysikokemiallisista ominaisuuksista riippuen. Testikemikaali on valmisteltava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

Testiolosuhteet

Liuotin/kantaja-aine

20. Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan kemikaalin kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista.

Positiiviset kontrollit

21. Tavanomaisesti käytetään rinnakkaisia positiivisen kontrollin eläimiä. Kuitenkin laboratoriot, joiden pätevyys on osoitettu (ks. 23 kohta) ja jotka soveltavat rutiininomaisesti näitä testejä, edellisen positiivisen kontrollin koe-eläimien DNA voidaan sisällyttää kuhunkin tutkimukseen, jotta menetelmän onnistunut lopputulos vahvistetaan. Tällaiset edellisten kokeiden DNA:t olisi saatava samoilta lajeilta ja tutkimuksen kohteena olevista kudoksista, ja ne olisi säilytettävä asianmukaisesti (ks. 36 kohta). Kun käytetään rinnakkaisia positiivisia kontrolleja, niitä ei tarvitse antaa samaa reittiä kuin testikemikaalia; olisi kuitenkin oltava tiedossa, että positiiviset kontrollit aiheuttavat mutaatioita yhdessä tai useammassa testikemikaalin kohdekudoksessa. Positiivisen kontrollin kemikaalien annokset olisi valittava siten, että aiheutetaan heikkoja tai kohtalaisia vaikutuksia, joilla arvioidaan kriittisesti kokeen suorituskykyä ja herkkyyttä. Taulukkoon 1 sisältyy esimerkkejä positiivisen kontrollin kemikaaleista ja joistain niiden kohdekudoksista.

Taulukko 1

Esimerkkejä positiivisen kontrollin kemikaaleista ja joistain niiden kohdekudoksista

Positiivisen kontrollin kemikaali ja CAS-nro	Einecs-nimi ja Einecs-nro	Ominaisuudet	Mutaation kohdekudos	
			Rotta	Hiiri
N-etyyli-N-nitrosourea (CAS-nro 759-73-9)	N-etyyli-N-nitrosourea (212-072-2)	Suoraan vaikuttava mutageeni	Maksa, keuhkot	Luuydin, paksusuoli, paksusuolen epiteeli, suolisto, maksa, keuhkot, perna, munuainen, munasolujen granuloosasolut, uroksen sukusolut

Positiivisen kontrollin kemikaali ja CAS-nro	Einecs-nimi ja Einecs-nro	Ominaisuudet	Mutaation kohdekudos	
			Rotta	Hiiri
Etyylikarbamaatti (uretaani) (CAS-nro 51-79-6)	Uretaani (200-123-1)	Mutageeni, edellyttää metabolista aktivointia, mutta aiheuttaa ainoastaan heikkoja vaikutuksia		Luudin, etumaha, ohutsuoli, maksa, keuhkot, perna
2,4 diaminotolueeni (CAS-nro 95-80-7)	4-metyyli-m-fenyleenidiamiini (202-453-1)	Mutageeni, edellyttää metabolista aktivointia, myös positiivinen Spi⁻-testissä	Maksa	Maksa
Bentso(a)pyreeni (CAS-nro 50-32-8)	Bentso[def]kryseeni (200-028-5)	Mutageeni, edellyttää metabolista aktivointia	Maksa, keuhkot	Luudin, rinta, paksusuoli, etumaha, rauhasmaha, sydän, maksa, keuhkot, uroksen sukusolut

Negatiiviset kontrollit

22. Negatiivisia kontrolleja, joissa käytetään pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta ja joita käsitellään muuten samalla tavalla kuin koeryhmiä, olisi sisällytettävä kuhunkin näytteenottokertaan. Jos käytettävissä ei ole aikaisempia tai julkaistuja kontrollitietoja, joissa osoitetaan, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta mitään haitallisia tai mutageenisiä vaikutuksia, olisi käytettävä myös kontrollia, jossa eläimiä ei käsitellä, kutakin näytteenottokertaa kohti, jotta kantaja-ainekontrollin hyväksyttävyys voidaan todeta.

Laboratorioiden pätevyyden varmistaminen

23. Näiden testien pätevyys olisi varmistettava osoittamalla, että niillä voidaan tuottaa julkaistujen tietojen (24) perusteella edellytettyjä tuloksia, kun kyseessä ovat: 1) mutaatiotaajuudet positiivisen kontrollin kemikaalien kanssa (mukaan lukien heikot vasteet), kuten ne, jotka luetellaan taulukossa 1, ei-mutageenit, kantaja-ainekontrollit; ja 2) siirtogeenin talteenotto genomisesta DNA:sta (esim. pakkauksien tehokkuus).

Mutanttien sekvensointi

24. Mutanttien DNA-sekvensointia ei tarvita sääntelyyn liittyvien vaatimusten osalta erityisesti, jos saadaan selkeä positiivinen tai negatiivinen tulos. Sekvensointitiedot voivat olla kuitenkin hyödyllisiä, kun tarkastellaan yksilöiden välistä korkeaa vaihtelua. Näissä tapauksissa sekvensointia voidaan käyttää, jotta 'jackpot-mutaatioiden' tai klonaalisten tapahtumien mahdollisuus suljetaan pois, tunnistamalla tietystä kudoksesta peräisin olevien ainutlaatuisten mutanttien osuus. Noin 10 mutantin sekvensointi kutakin kudosta ja kutakin eläintä kohti pitäisi riittää sen määrittämiseksi, vaikuttavatko klonaaliset mutantit mutaatiotaajuuteen; jopa 25 mutantin sekvensointi voi olla tarpeen, jotta mutaatiotaajuutta korjataan matemaattisesti klonaalisuuden osalta. Mutanttien sekvensointia voidaan myös harkita, kun mutaatiotaajuudessa havaitaan pientä lisäystä (eli kun ylitetään jonkin verran käsittelemättömän kontrollin arvot). Erot käsiteltyjen ja käsittelemättömien eläinten mutanttiryhmien mutaatiokirjon välillä voivat tukea mutageenistä vaikutusta (29). Mutaatiokirjo voi olla myös hyödyllinen mekanististen hypoteesien kehittämiseksi. Kun sekvensointi sisällytetään tutkimussuunnitelmaan, tällaisten tutkimusten suunnittelussa olisi erityisesti otettava huomioon, etenkin näytettä kohti sekvensointujen mutanttien määrän osalta, riittävän tilastollisen voiman aikaansaaminen sovellettavan tilastollisen mallin mukaisesti (ks. 43 kohta).

TESTIN SUORITTAMINEN

Eläinten lukumäärä ja sukupuoli

25. Eläinten lukumäärä ryhmää kohti olisi määriteltävä ennalta, jotta näin tarjotaan riittävä tilastollinen voima havaita ainakin mutaatiotaajuuden kaksinkertaistuminen. Ryhmä koostuu vähintään viidestä eläimestä; jos tilastollinen voima ei riitä, eläinten määrää on lisättävä tarpeen mukaan. Normaalisti olisi käytettävä uroksia. Voi olla tapauksia, joissa pelkästään naaraiden testaaminen on perusteltua; esimerkiksi silloin, kun testataan nimenomaan naisia varten tarkoitettuja lääkkeitä tai kun tutkitaan nimenomaan naisten aineenvaihduntaa. Jos sukupuolten välillä on huomattavia eroja myrkyllisyysvaikutusten tai metaboloitumisen osalta, tarvitaan uroksilla ja naarailla suoritettavia malleja.

Altistusaika

26. Koska seulonnan perusteella mutaatiot kertyvät kussakin käsittelyssä, tarvitaan toistuvan annostelun tutkimusta, jossa annos annetaan päivittäin 28 vuorokauden ajan. Tätä pidetään yleisesti hyväksyttävänä, koska näin tuotetaan riittävä kertymä heikkojen mutageenien aiheuttamia mutaatioita ja koska tarjotaan riittävän pitkä altistusaika mutaatioiden seulonnalle elimissä, joiden proliferaatio on hidasta. Vaihtoehtoiset käsittelytavat voivat sopiva joihinkin arviointeihin, ja näitä vaihtoehtoisia annostussuunnitelmia olisi perusteltava tieteellisesti testiprotokollassa. Altistusten kesto ei saisi olla lyhyempi kuin ajanjakso, jota tarvitaan kaikkien asiaankuuluvien entsyymien täydelliseen induktioon, ja lyhyempikestoisten altistusten vuoksi voidaan joutua käyttämään useita näytteenottoaikoja, jotka ovat asianmukaisia elimille, joiden proliferaatioaste on erilainen. Joka tapauksessa kaikkia saatavilla olevia tietoja (esim. yleisestä myrkyllisyydestä tai metaboloitumisesta ja farmakokinetiikasta) olisi käytettävä, kun protokollaa perustellaan erityisesti, jos edellä mainituista vakiomuotoisista suosituksista poiketaan. Vaikka herkkyyttä lisättäisiin kahdeksan viikkoa pidemmillä altistusajoilla, niitä pitäisi selvittää ja perustella, koska pitkät altistusajat voivat tuottaa ilmeistä kasvua mutaatiotaajuudessa kloonaalisen laajenemisen välityksellä (29).

Annostasot

27. Annostasojen pitäisi perustua samasta annostelureitistä tehdyn yleistä toksisuutta mittaavan raja-annostutkimuksen tuloksiin tai olemassa oleviin subakuuttia toksisuutta koskeviin tutkimuksiin. Saman jyrsijäkannan ei-siirtogeenisiä eläimiä voidaan käyttää annosrajojen määrittelyssä. Annosvastetietojen saamisen vuoksi päätestin täydelliseen tutkimukseen olisi sisällyttävä negatiivinen kontrolliryhmä (ks. 22 kohta) ja vähintään kolme toisistaan asianmukaiselle välille sijoitettua annostasoa, paitsi silloin, kun on käytetty raja-annosta (ks. 28 kohta). Suurimman annoksen olisi oltava suurin siedettävä annos. Suurin siedettävä annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sellaisia myrkyllisyysoireita, että samaan annostussuunnitelmaan perustuvan korkeamman annostason voidaan odottaa johtavan kuolemaan. Kemikaalit, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), ja kemikaalit, joissa esiintyy toksikokineettisten ominaisuuksien saturaatiota, voivat olla annosten asettamista koskevien kriteerien osalta poikkeustapauksia, ja niitä olisi arvioitava tapauskohtaisesti. Käytetyillä annostasoilla olisi katettava mittausalue, joka ulottuu enimmäismäärästä vähäiseen toksisuuteen tai toksisuuden puuttumiseen.

Raja-annostesti

28. Jos raja-annoksen määrittelyä koskevissa kokeissa tai samankaltaisista jyrsijäkannoista olemassa olevissa tiedoissa osoitetaan, että käsittelyjärjestelmässä, jossa annetaan vähintään raja-annos (ks. jäljempänä), ei tuoteta mitään havaittavia myrkyllisyysvaikutuksia ja jos genotoksisuutta ei oleteta rakenteellisesti samankaltaisia kemikaaleja koskevien tietojen perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ole ehkä välttämätön. Kun kyseessä on 28 vuorokauden altistusaika (eli 28 päivittäistä käsittelyä), raja-annos on 1 000 mg/painokilo/vrk. Kun altistusaika on 14 päivää tai lyhyempi, raja-annos on 2 000 mg/painokilo/vrk (28 päivittäisestä käsittelystä poikkeavat annostelusuunnitelmat olisi perusteltava tieteellisesti protokollassa; ks. 26 kohta).

Antotapa

29. Testikemikaalia annetaan yleensä letkuruokinnassa mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Yleensä testin suunnittelussa olisi otettava huomioon oletettu ihmisen altistusreitti. Sen vuoksi muut altistusreitit (kuten altistus juomaveden välityksellä, ihonalaista tai laskimonsisäistä reittiä, paikallisesti iholle applikoituna, inhalaationa, henkitorveen tiputettuna, ravinnon tai implantaation kautta) voivat olla hyväksyttäviä, jos niitä voidaan perustella. Injektiota vatsaonteloon ei suositella, koska se ei ole ihmisen kannalta fysiologisesti merkityksellinen altistusreitti. Suurin letkuruokinnan tai injektion avulla kerralla annettava nestemäärä määräytyy koe-eläimen koon mukaan. Tilavuus ei saisi ylittää 2:ta ml/100 g eläimen painoa. Tätä suurempien määrien käyttöä olisi perusteltava. Poikkeuksena tästä ovat ärsyttävät tai syövyttävät aineet, joiden kohdalla voidaan yleensä todeta vaikutusten voimistuminen suurempia pitoisuuksia käytettäessä. Testiaineen nestemäärän tilavuusvaihtelu minimoidaan pitoisuutta muuttamalla, jotta kaikilla annostasoilla varmistetaan tilavuudeltaan sama nestemäärä.

Näytteenottoaika

Somaattiset solut

30. Näytteenottoaika on kriittinen muuttuja, koska se määräytyy sen ajanjakson perusteella, jota tarvitaan mutaatioiden fiksoitumiseen. Tämä ajanjakso on kudosspesifinen ja se vaikuttaa liittyvän solupopulaation korvautumista koskevaan ajanjaksoon. Luuydin ja suolisto reagoivat nopeasti ja maksa paljon hitaammin. Sopiva kompromissi

mutaatiotaajuuksien mittaamiseksi nopeasti ja hitaasti proliferoituvissa kudoksissa on 28 peräkkäisen vuorokauden käsittely (kuten 26 kohdassa todetaan) ja kolmen vuorokauden näytteenotto lopullisen käsittelyn jälkeen; voi olla mahdollista, että mutaatiotaajuuden maksimi ei ilmene näissä olosuhteissa sellaisten kudosten osalta, joiden proliferaatio on hidasta. Jos tällaisilla kudoksilla on erityistä merkitystä, myöhempi 28 päivän näytteenottoajankohta, joka seuraa 28 päivän altistusaikaa, voi olla tarkoituksenmukaisempi (16)(29). Tällaisissa tapauksissa myöhempi aika korvaisi 3 päivän näytteenottoajan ja edellyttäisi tieteellisiä perusteluja.

Sukusolut

31. Siirtogeenisillä jyrsijöillä tehtävät testit soveltuvat hyvin tutkimuksiin, jotka koskevat geenimutaatioiden syntyä uroksen sukusoluissa (7)(8)(27), joissa spermatogeneesin ajoitus ja kinetiikka on määritelty hyvin (27). Koska analyysia varten saatavilla olevia munasoluja on vähän jopa superovulaation jälkeen ja koska oosyytissä ei ole DNA-synteesiä, siirtogeenisten eläinten testeissä ei voida määritellä naaraiden sukusolujen mutaatiota (31).

32. Uroksen sukusolujen näytteenottoajat olisi valittava niin, että näytteet otetaan sarjasta altistettuja solutyyppejä koko sukusolujen kehityksen ajan ja että soluja on altistettu tarpeeksi vaiheessa, joka on näytteenoton kohteena. Kehittyvien sukusolujen kehittymisaika spermatogoniaalisista kantasoluista kypsiksi siittiöiksi, jotka siirtyvät siemenjohtimeen/lisäkiveksen häntään, on hiirellä noin 49 vuorokautta (36) ja rotalla noin 70 vuorokautta (34)(35). Kolmen päivän näytteenottoaikana, joka seuraa 28 vuorokauden altistusta, siemenjohtimen/lisäkiveksen hännästä (7)(8) kerätty siemenneste edustaa solupopulaatiota, joka on altistettu suunnilleen spermatogeneesin jälkipuoliskolla. Tähän sisältyy siis meioottinen ja postmeioottinen vaihe, mutta ei spermatogoniota tai kantasoluja koskevaa vaihetta. Jotta siemenjohtimen/lisäkiveksen hännän soluista, jotka olivat siittiökehityksen kantasoluja altistusaikana, otetaan näyte asianmukaisesti, altistuksen jälkeen tarvitaan täydentävää 7 viikon (hiiret) tai 10 viikon (rotat) näytteenottoaikaa.

33. Soluihin, jotka irrotetaan siementiehyeistä 28 + 3 vuorokauden jälkeen, sisältyy sekapopulaatioita, joita on käsitelty kehittyvien sukusolujen kaikissa eri vaiheissa (7)(8). Näytteenotolla näistä soluista geenimutaation seulontaa varten ei tarjota yhtä täsmällistä arviointia vaiheista, jolloin sukusolujen mutaatioita aiheutetaan, kuin silloin, jos näyte otetaan siemenjohtimesta/lisäkiveksen hännästä (koska tiehyeistä otetussa näytteissä esiintyy sukusolujen tyyppien osalta vaihtelua ja näytteeseen sisältyy joitain somaattisia soluja, jotka kontaminoivat tämän solupopulaation). Solunäytteen otto siementiehyistä siemenjohtimen/lisäkiveksen hännän siemennesteen näytteiden lisäksi pelkästään 28 + 3 vuorokauden näytteenotto-ohjelmassa tarjoaa kuitenkin jotain tietoja soluista, jotka on altistettu sukusolujen useampien kehitysvaiheiden aikana, ja tämä voi olla hyödyllinen keino seuloa joitain sukusolujen mutageenejä.

Tarkkailu

34. Yleisiä kliinisiä havaintoja pitäisi tehdä ainakin kerran päivässä, mieluiten samaan aikaan joka päivä ottaen huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen ennakoidut vaikutukset ovat suurimmillaan. Eläinten terveydentila on kirjattava. Kaikkien eläinten sairastuvuutta ja kuolleisuutta on havainnoitava ainakin kahdesti vuorokaudessa. Kaikki eläimet olisi punnittava ainakin kerran viikossa ja lopetettaessa. Ravinnon kulutus olisi mitattava ainakin kerran viikossa. Mikäli testikemikaalia annostellaan juomaveteen, veden kulutusta olisi mitattava, kun vesi vaihdetaan tai ainakin kerran viikossa. Eläimet, joilla ilmenee ei-letaaleja merkkejä liiallisesta myrkytysvaikutuksesta, olisi lopetettava ennen tutkimusajan päättymistä (23).

Kudosnäytteiden kerääminen

35. Kudosnäytteiden keräämistä koskevat perusteet olisi määritettävä selkeästi. Koska mutaatioiden muodostumista voidaan tutkia lähes kaikista kudoksista, kerättävien kudosten valinnan olisi perustuttava tutkimuksen suorittamisen taustalla olevaan syyhyn ja olemassa oleviin tutkittavana olevan kemikaalin mutageenisyyttä, karsinogeenisyyttä tai toksisuutta koskeviin tietoihin. Tärkeisiin tarkasteltaviin näkökohtiin pitäisi sisältyä altistusreitti (joka perustuu todennäköisiin ihmisen altistumista koskevaan reittiin (reitteihin)), ennustettava kudosjakauma ja mahdollinen vaikutusmekanismi. Jos taustatietoja ei ole, useita tutkimuksen kannalta mahdollisesti merkittäviä somaattisia kudoksia voidaan kerätä. Niiden pitäisi edustaa nopeasti lisääntyviä, hitaasti lisääntyviä ja kontaktikohdan kudoksia. Lisäksi siemenjohtimen/lisäkiveksen hännän siittiöitä ja siementiehyeiden kehittyviä sukusoluja (kuten kuvataan 32 ja 33 kohdassa) olisi kerättävä, ja ne olisi säilytettävä, jos myöhemmin tarvitaan lisätutkimuksia sukusolujen mutageenisyydestä. Elinten painot olisi mitattava. Suurempien elinten osalta kaikista eläimistä olisi punnittava sama ala.

Kudoksien ja DNA:n säilyttäminen

36. Kudokset (tai kudoshomogenaatit) olisi säilytettävä –70 °C:ssa tai alemmassa lämpötilassa, ja niitä voidaan käyttää DNA:n eristämiseen viiden vuoden aikana. Eristetty DNA, joka varastoidaan jäähdytettynä 4 °C:een asianmukaisessa puskuriliuoksessa, olisi käytettävä mutaatioanalyysia varten optimaalisesti vuoden sisällä.

Kudosten valitseminen mutaatioanalyysia varten

37. Kudosten valinnan olisi perustuttava seuraaviin näkökohtiin: 1) altistusreitti tai ensimmäinen kontaktikohta (esim. rauhasmaha, jos annos annetaan suun kautta; keuhkot, jos annos annetaan inhalaationa; tai iho, jos käytetään paikallisesti ihon alueelle aplikoitavaa annosta); ja 2) yleisiä myrkyllisyysvaikutuksia koskevissa tutkimuksessa havaitut farmakokineettiset parametrit, jotka osoittavat kudoksen disposition, pidättymisen tai kertymisen, tai myrkyllisyysvaikutuksien kohde-elimet. Jos tutkimukset suoritetaan karsinogeenisyystutkimusten seurantaa varten, olisi tarkasteltava karsinogeenisyysvaikutuksien kohdekudoksia. Kudosten valitsemisella tutkimusta varten pitäisi maksimoida sellaisten kemikaalien havaitsemista, jotka toimivat suoraan *in vitro* -mutageeneinä, metaboloituvat nopeasti, jotka ovat erittäin reaktiivisia tai huonosti imeytyviä tai joiden kohdekudos määräytyy altistusreitin perusteella (6).

38. Jos taustatietoja ei ole käytettävissä — ja kun otetaan huomioon altistusreitistä johtuva kontaktikohta –, olisi arvioitava maksan ja ainakin yhden nopeasti jakaantuvan kudoksen (kuten rauhasmaha, luuydin) mutageenisyytta. Useimmissa tapauksissa edellä mainitut vaatimukset voidaan saavuttaa kahden huolellisesti valitun kudoksen analyyseista, mutta joissain tapauksessa tarvitaan kolmea tai useampaa kudosta. Jos on syytä tarkastella erityisesti sukusoluihin aiheutuvia vaikutuksia, kuten positiivisia vasteita somaattisissa soluissa, sukusolujen kudoksia olisi arvioitava mutaatioiden osalta.

Mittausmenetelmät

39. Vakiomuotoisia laboratoriomenettelyjä tai julkaistuja menetelmiä mutanttien seulomiseksi saadaan suositelluista siirtogeenisiä eläimiä koskevista malleista: *lacZ* lambda bacteriophage and plasmid -malli (30); *lacI* mouse -malli (2)(18); *gpt* delta mouse -malli (22); *gpt* delta rat -malli (28); *cII*-malli (17). Muutoksia olisi perusteltava ja dokumentoitava asianmukaisesti. Tietoja useista pakkauksista voidaan yhdistää ja käyttää, jotta saadaan sopiva määrä plakkeja tai pesäkkeitä. Tarve suurelle määrälle pakkausten reaktioita — jotta saadaan sopiva määrä plakkeja — voi kuitenkin olla osoitus heikkolaatuisesta DNA:sta. Tällaisissa tapauksissa tietoja olisi tarkasteltava varovaisesti, koska ne voivat olla epäluotettavia. Plakkien tai pesäkkeiden optimaalista kokonaismäärää DNA-näytettä kohti sääntelee tilastollinen todennäköisyys seuloa riittävän monta mutanttia tietyllä spontaanimutaatiotaajuudella. Yleisesti ottaen tarvitaan vähintään 125 000–300 000 plakkia, jos spontaanimutaatiotaajuus on 3×10^{-5} (15). Big Blue® *lacI* -testimallin osalta on tärkeää osoittaa, että koko sarja mutanttien värin fenotyyppejä voidaan havaita sisällyttämällä sopivia värikontrolleja rinnakkain kunkin maljauksen kanssa. Kudoksia ja saatua näytteitä (eriä) olisi käsiteltävä ja analysoitava käyttäen lohkokoetta, jossa kantaja-ainekontrollin/liuotinkontrollin ryhmän, positiivisen kontrollin ryhmän (jos sitä käytetään) tai positiivisen kontrolli-DNA:n ryhmän (tarvittaessa) ja kunkin koeryhmän erät käsitellään yhdessä.

TIEDOT JA RAPORTOINTI

Tulosten käsittely

40. Yksittäisiä eläimiä koskevat tiedot olisi esitettävä taulukossa. Kokeellinen yksikkö on eläin. Raporttiin olisi sisällyttävä kustakin eläimestä plakkia muodostavien yksiköiden tai pesäkkeitä muodostavien yksiköiden kokonaismäärä, mutanttien määrä ja kunkin kudoksen mutaatiotaajuus. Jos esiintyy useita reaktioita pakkausta/vapautumista kohti, olisi ilmoitettava reaktioiden määrä DNA-näytettä kohti. Tiedot kustakin yksittäisestä reaktiosta olisi säilytettävä, mutta ainoastaan plakkia muodostavien yksiköiden tai pesäkkeitä muodostavien yksiköiden kokonaismäärä olisi ilmoitettava. Tiedot 34 kohdassa tarkoitetuista myrkyllisyysvaikutuksista ja kliinisistä oireista olisi ilmoitettava. Sekventointitulokset olisi esitettävä kustakin analysoidusta mutantista. Tästä johtuvat mutaatiotaajuutta koskevat laskelmat kustakin eläimestä ja kudoksesta olisi esitettävä.

Tilastollinen arviointi ja tulosten tulkinta

41. Positiivisen tuloksen määrittelemistä varten on useita kriteerejä, kuten annoksesta riippuva mutaatiotaajuuden lisääntyminen, tai mutaatiotaajuuden selkeä lisääntyminen yhdessä koeryhmässä verrattuna liuotinta/kantaja-ainetta saavaan kontrolliryhmään. Vähintään kolmea annosryhmää olisi analysoitava, jotta tarjotaan riittävästi tietoa altistumis-vastesuhdetta koskevaa analyysia varten. Vaikka tulosten biologinen merkitys on ensisijainen näkökohta, asianmukaisia tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testin tulosten arvioinnissa (4)(14)(15)(25)(26). Käytetyissä tilastollisissa testeissä kokeellisena yksikkönä olisi pidettävä eläintä.

42. Testikemikaalia, joiden osalta tulokset eivät täytä edellä mainittuja kriteerejä missään kudoksessa, pidetään tässä testissä ei-mutageenisenä. Negatiivisen tuloksen biologista merkitystä varten kudosten altistus olisi vahvistettava.

43. DNA:n sekvensointianalyysien osalta on saatavilla useita tilastollisia menetelmiä, joilla tuetaan tulosten tulkintaa (1)(5)(9)(19).

44. Sen tarkastelemisella, ovatko havaitut arvot aikaisemman kontrollin arvojen puitteissa, voidaan antaa ohjeita, kun arvioidaan vasteen biologista merkitystä (32).

Tutkimusseloste

45. Tutkimusselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— tunnistetiedot mukaan lukien CAS-numero, jos tiedossa,

— lähde, erän numero, jos saatavilla

— fysikaalinen olomuoto ja puhtaus

— tutkimuksen suorittamiselle merkitykselliset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

— testikemikaalin stabiilius, jos tiedossa

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa

— ruoka-aineen, juomaveden tai inhalaatioiden formulointi

— formulointien analyyttiset määritelmät (kuten stabiilius, homogeenisyys, nimelliset pitoisuudet)

Koe-eläinlajit:

— käytetty eläinlaji/kanta ja perustelu sen valinnalle

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli

— toimittaja, häkit, ravinto ja niin edelleen

— eläinten yksilöllinen paino testin alussa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Testiolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollitiedot

— raja-annostutkimuksen tulokset

— annostasojen valintaperusteet

— testikemikaalin valmistelun yksityiskohdat

— yksityiskohtaiset tiedot testikemikaalin antotavasta

— antotavan valintaperusteet

— eläinten myrkyllisyysvaikutusten mittaamista koskevat menetelmät, missä käytetään tarvittaessa histopatologisia tai verianalyyseja, ja tiedot siitä, kuinka usein eläimiä koskevat havainnot ja ruumiinpainon mittaukset otettiin

— menettelyt, joilla varmistetaan, että testikemikaali välittyi kohdekudokseen tai verenkiertoon, jos saadaan negatiivisia tuloksia

— todellinen annos (mg/painokilo/vrk), joka lasketaan ravintoon/juomaveteen sekoitetun testikemikaalin pitoisuudesta (ppm) ja kulutuksesta tarvittaessa

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta

— yksityiskohtaiset tiedot koe- ja näyteaikataulusta ja perustelut valinnoille

— lopettamistapa

— menetelmät eristää ja säilöä kudoksia

— menetelmät eristää jyrsijöiden genomista DNA:ta, eristää siirtogeeni genomisesta DNA:sta ja kuljettaa siirtogeeninen DNA bakteeri-isäntään

— kaikkien solujen, mittaussarjojen ja reagenssien lähde ja eränumerot (tarvittaessa)

— mutanttien laskemista koskevat menetelmät

— mutanttien molekyylianalyysi ja käyttö klonaalisuuden ja/tai mutaatiotaajuuden laskennan korjaamisessa (tarvittaessa)

Tulokset:

— eläimen kunto koeaikaa ennen ja sen aikana, mukaan lukien toksisuusoireet

— ruumiin ja elinten painot lopetettaessa

— kunkin kudoksen/eläimen osalta mutanttien lukumäärä, arvioitujen plakkien tai pesäkkeiden lukumäärä, mutaatiotaajuus

— kunkin kudoksen/eläinryhmän osalta pakkausreaktioiden lukumäärä DNA-näytettä kohti, mutanttien kokonaismäärä, keskimääräinen mutaatiotaajuus, keskihajonta

— annos-vastesuhde, jos mahdollista

— kunkin kudoksen/eläimen osalta yksittäisten mutanttien lukumäärä, keskimääräinen mutaatiotaajuus, jos mutaatioista on tehty molekyylianalyysi

— rinnakkaiset ja aikaisemmat negatiivista kontrollia koskevat tiedot, joihin sisältyvät vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonta

— rinnakkaiset positiivista kontrollia (tai ei-rinnakkaiset DNA:n positiivista kontrollia) koskevat tiedot

— analyyttiset määritelmät, jos saatavilla (kuten DNA, pakkauksessa käytetyt pitoisuudet, DNA:n sekvensointitiedot)

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät

Tulosten pohdinta

Päätelmä

KIRJALLISUUSVIITTEET

(1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol.*, 194: 391–396.

(2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res.*, 518: 107–112.

(3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657–659

(4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

(5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

(6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.

(7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485–7489.

(8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res.*, 388(2–3): 197–212.

(9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.

(10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations' *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971–7975.

(11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125–136.

(13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, 705: 96–106.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.

(15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253–259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003)," Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1–6.

(17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene TARGET', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073–9078.

(18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212–218.

(19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772–778.

(20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi$^-$ and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465–470.

(21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi$^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9–15.

(22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

(23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231–245.

(26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, … G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

(27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598: 164–193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1): 71–78.

(29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res.*, 540: 141–151.

(30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations' *in vivo* in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, s. 391–410.

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res.*, 578(1–2): 117–123.

(32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, Nº 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.

(34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198–236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, s. 1071–1148.

(36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25–36.

Lisäys

MÄÄRITELMÄT:

Altistusaika: se ajanjakso kokonaisuudessaan, jolloin eläimelle annetaan annoksia.

Emäsparin korvautuminen: mutaatiotyyppi, joka johtaa yhden DNA:n nukleotidiemäksen korvautumisen toisella DNA:n nukleotidiemäksellä.

Kapsidi: viruspartikkelin kuorena oleva proteiini.

Kemikaali: aine tai aineiden seos.

Kloonaalinen laajeneminen: useiden solujen tuotanto yhdestä solusta (mutanttisolu).

Pesäkkeitä muodostava yksikkö: elinkykyisten (elävien) bakteerien määrän mitta.

Konkatameeri: pitkä jatkuva biomolekyyli, joka koostuu moninkertaisista samanlaisista kopioista, jotka liittyvät sarjaan.

Cos-kohta: 12 nukleotidin segmentti yksijuosteisesta DNA:sta, joka on olemassa lambda-faagin (bakteriofagi lambda) kaksijuosteisen genomin kummassakin päässä.

Deleetio: mutaatio, jossa genomista häviää yksi tai useampi (peräkkäinen) nukleotidi.

Elektroporaatio: sähköiskujen käyttäminen, jolla lisätään solun kalvojen läpäisykykyä.

Endogeeninen geeni: genomiin kuuluva geeni.

Ekstrabinomiaalinen vaihtelu: suurempi vaihtelu populaation osuuden toiston arviossa kuin oletettaisiin, jos populaatio olisi binomijakautunut.

Lukukehysmutaatio: geneettinen mutaatio, jonka aiheuttavat useiden nukleotidien insertiot tai deleetiot ja jota ei voida jakaa tasan kolmella DNA-sekvensissä, joka koodaa proteeinia/peptidiä.

Insertio: yhden tai useamman nukleotidin emäsparin liittyminen DNA-sekvenssiin.

Jackpot-mutaatio: suuri määrä mutantteja, jotka syntyivät klonaalisella laajentamisella yhdestä mutaatiosta.

Suuret deleetiot: usean kiloemäksen deleetiot DNA:ssa (jotka havaitaan tehokkaasti Spi^- selection- ja lacZ plasmid -- mallin testeissä).

Ligaatio: DNA-molekyylien kahden pään välinen kovalenttinen side käyttäen DNA-ligaasia.

Mitogeeni: kemikaali, joka stimuloi solua kiihdyttämään solunjakautumista käynnistäen mitoosin (eli solun jakautumisen).

Neutraali geeni: geeni, johon positiivinen tai negatiivinen selektiivinen paine ei vaikuta.

Pakkaus: infektoivan faagin partikkeleiden, jotka ovat peräisin faagin kapsidin ja häntäproteiinien preparaatiosta, ja faagin DNA-molekyylien konkatameerin synteesi. Käytetään yleisesti pakkaamaan DNA:ta, joka on kloonattu lambdavektoriin (jota erottavat cos-kohdat), infektoiviksi lambdahiukkasiksi.

Pakkaustehokkuus: tehokkuus, jolla pakatut bakteriofagit vastaanotetaan bakteeri-isännässä.

Plakin muodostava yksikkö (PFU): elinkykyisten bakteriofagien määrän mitta.

Pistemutaatio: yleinen termi mutaatiolle, joka vaikuttaa vain lyhyeen DNA-sekvenssiin mukaan lukien pienet insertiot, deleetiot ja emäsparin korvautumiset.

Positiivinen valinta: menettely, jonka perusteella ainoastaan mutantit voivat selviytyä.

Reportterigeeni: geeni, jonka mutanttigeenituote on helposti havaittavissa

Näytteenottoaika: se eläimen lopettamista edeltävän ajanjakson loppu, jonka aikana kemikaalia ei anneta ja jonka aikana korjaamattomat DNA-vauriot kiinnittyvät stabiileihin mutaatioihin.

Sukkulavektori: vektori, joka on muodostunut niin, että se voi toimia kahdessa eri isäntäsolutyypissä; vastaavasti DNA:ta, joka liitetään sukkulavektoriin, voidaan testata tai käsitellä kahdessa eri solutyypissä tai kahdessa eri organismissa.

Testikemikaali: mikä tahansa aine tai seos, jota testataan käyttämällä tätä testimenetelmää.

Siirtogeeninen: sellainen organismi (tai organismiin liittyvä tai siitä peräisin oleva organismi), jonka genomia on muutettu siirtämällä siihen toisen lajin geeni tai geenejä."

ISSN 1977-0812 (sähköinen julkaisu)
ISSN 1725-261X (painettu julkaisu)



Euroopan unionin julkaisutoimisto
2985 Luxemburg
LUXEMBURG

FI